



Instituto Politécnico do Porto  
Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto  
Departamento de Anatomia do Instituto ciências Biomédicas Abel Salazar

**Obesidade e cancro da Próstata:**  
**Avaliação do efeito dos adipócitos nas células RM1 de carcinoma**  
**da próstata**

Dissertação submetida à Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde, sob orientação da Professora Doutora Mariana Monteiro, e co-orientação do Professor Doutor Rúben Fernandes.

Setembro de 2013

Aos meus pais

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação, a fim de concluir o meu Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde, apenas foi possível devido ao empenho e dedicação de um conjunto de intervenientes, aos quais pretendo felicitar e agradecer.

Ao Departamento de Anatomia do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, em especial ao Professor Doutor Artur Águas por ter consentido a realização do meu projeto.

A todos os elementos do Departamento de Anatomia, em especial ao Sr. Costa, à D. Manuela, ao Gil e ao Sr. Duarte pelo maravilhoso acolhimento e por toda a simpatia sempre demonstrada.

À Professora Doutora Mariana por todo o conhecimento científico transmitido, constante dedicação, encorajamento, simpatia, paciência, motivação, compreensão e disponibilidade, um enorme e sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Rúben Fernandes por me ter encaminhado para este projeto, pela sua co-orientação e por toda ajuda e apoio na realização deste projeto, o meu obrigado.

Aos meus colegas de laboratório do Departamento de Anatomia do Instituto Ciências Biomédicas Abel Salazar, o meu agradecimento por todo o apoio científico e laboratorial na execução de procedimento indispensáveis à concretização deste projeto.

Em especial queria agradecer à Sofia e à Ana, por manterem sempre a boa disposição no laboratório, por toda ajuda prestada, principalmente nesta etapa final e por aquela palavra de força no momento certo.

A minha “pseudo-mãe” de laboratório, a Madalena, por todo o apoio e por todos os ensinamentos transmitidos, que me fizeram crescer muito como pessoa e como profissional.

E ao Dr. Tiago Morais por toda a ajuda prestada e por compactuar com mentiras que a Sofia me pregava. A todos, um muito obrigado por todos os bons momentos que tornaram este ano maravilhoso. Sem todos vocês tudo seria mais triste.

À Luzia e a Raquel, por toda a troca de ideias e sugestões científicas, que me permitiram melhorar os meus conhecimentos.

À Joana, minha colega de laboratório e atual companheira de casa, por todo o companheirismo e apoio nos momentos que mais precisei.

À Andreia Ribeiro e à Daniela Vasconcelos pelo conhecimento laboratorial transmitido, que me auxiliou no desenvolvimento deste trabalho

À Dra. Alexandra Gouveia e a Dra. Adriana Rodrigues por toda ajuda e conhecimento transmitido para as culturas de células.

Ao Professor Pedro da Escola Superior de Tecnologia da Saúde do Porto pela disponibilidade, apoio e conhecimento científico transmitido, que contribuíram para o enriquecimento deste trabalho.

Aos meus colegas de Mestrado, em especial aqueles que contactei mais durante este ano, à Diana, Marisa, Manu, Carla Barreira, por todo o apoio sempre demonstrado.

A todos os meus amigos, em especial aqueles que mesmo de longe, nunca deixaram de me apoiar.

Ao Mário, por todo o apoio dispensado ao longo desta etapa. Pelos dias de seca à minha espera no ICBAS. Por toda a paciência, força e ajuda que sempre me deu, sobretudo por aquelas palavras de incentivo e de conforto nos momentos menos bons, por ter estado sempre ao meu lado, o meu muito obrigado.

O meu maior e sincero agradecimento aos meus pais, à minha irmã, os meus grandes pilares, pela maravilhosa e compreensiva família que são, por me terem permitido concretizar mais esta etapa da minha vida, por todo o apoio incondicional que sempre me deram. Sem vocês nunca teria conseguido....

## **Resumo/Abstract**

O cancro da próstata é o segundo cancro mais frequente e a sexta causa de morte mundial por cancro no sexo masculino. A obesidade tem sido associada ao aumento da incidência e mortalidade por cancro, com alguma controvérsia. As alterações nas expressões de adipocinas associadas à obesidade têm sido um dos diversos mecanismos propostos para explicar a associação entre a obesidade e o cancro da próstata, nomeadamente na promoção do desenvolvimento e progressão celular do tumor.

O objetivo deste trabalho é avaliar o efeito dos fatores produzidos pelos pré-adipócitos e os adipócitos na proliferação, migração e invasão das células de carcinoma da próstata independentes dos androgénios.

As células RM1 foram cultivadas na presença de diferentes concentrações de insulina e leptina, bem como em meio condicionado (MC) de pré-adipócitos e adipócitos e co-cultivadas em sistema de transwells, com as mesmas células. A proliferação celular das RM1 foi avaliada recorrendo a contagem celular em câmara de Neubauer e em citómetro de fluxo, e aos ensaios metabólicos alamar blue e XTT. Efetuou-se um ensaio de migração por dano nas células RM1 na presença dos meios condicionados. A invasão das células foi avaliada recorrendo a um sistema de transwells, com membrana de matrigel, quando cultivadas com pré-adipócitos e adipócitos.

A insulina aumentou significativamente a proliferação celular, ao contrário da leptina que não teve efeito. O meio condicionado dos pré-adipócitos aumentou ligeiramente a proliferação, enquanto meio condicionado dos adipócitos de 1 e 2 dias aumentou significativamente a proliferação das células RM1 ( $p < 0.01$ ), quando avaliada por XTT. Na câmara de Neubauer não se verificaram diferenças significativas na proliferação celular. Relativamente à migração celular, observou-se um aumento significativo da migração das células RM1 cultivadas com meio condicionado de adipócitos (MCA) e pré-adipócitos (MCPA) em comparação com o controlo ( $p < 0.01$ ). Observou-se um aumento significativo da invasão de células RM1 cultivadas com adipócitos e pré-adipócitos ( $p < 0.05$ ). Os adipócitos aumentaram significativamente a proliferação das células RM1 em co-cultura ( $p < 0.01$ ).

Em conclusão, as células RM1 parecem ser influenciadas por fatores secretados pelos adipócitos, capazes de aumentar a sua capacidade de proliferar, invadir e migrar.

**Palavras-chave:** Cancro da próstata, obesidade, meio condicionado, proliferação, invasão, migração.

Prostate cancer is the second most frequent cancer and the sixth leading cause of death from cancer in men worldwide. Although controversial, obesity has been associated with increased prostate cancer incidence and mortality. Changes in adipokine expression associated with obesity have been one of the mechanisms proposed to explain the association between obesity and prostate cancer, particularly in promoting the development and progression of the tumor cell.

The main goal of this study is to evaluate the effect of preadipocyte and adipocyte secretome in the proliferation, migration and invasion of androgen insensitive prostate carcinoma murine cells (RM1).

RM1 cells were cultured in the presence of different concentrations of insulin and leptin, as well as co-cultured in transwells system with preadipocytes and adipocytes and in their conditioned medium (CM). RM1 cell proliferation was assessed by cell counting on the Neubauer chamber, in flow cytometer and by performing alamar blue and XTT viability tests. An injury assay, Wound Healing was performed in RM1 cells cultured with conditioned media. Cellular invasion was assessed by using transwells systems, with matrigel membrane, when cultured with adipocytes and preadipocytes.

Insulin significantly increased cell proliferation in contrast to leptin which has no effect. When measured by XTT assay, preadipocyte conditioned media slightly increased RM1 proliferation, while 1 and 2 days conditioned media of adipocytes significantly increased the RM1 cell proliferation ( $p < 0.01$ ). Cell proliferation showed no differences when measured in Neubauer chamber. For cell migration, there was a significant increase in migration of RM1 cells cultured with adipocyte (ACM) and preadipocytes (PACM) conditioned media when compared to control ( $p < 0.01$ ). A significant increase in RM1 cell invasion was observed in cells cultured with adipocytes and preadipocytes ( $p < 0.05$ ) and adipocytes significantly increased the RM1 cells proliferation in co-culture ( $p < 0.01$ ).

In conclusion, prostate carcinoma RM1 cells seem to be influenced by factors secreted by adipocytes which are able to increase their ability to proliferate, migrate and invade.

**Keywords:** Prostate cancer, obesity, conditioned media, proliferation, invasion, migration.

## **Índice**

Resumo/Abstract.....	I
Índice .....	III
Índice de Abreviaturas .....	VI
Índice de Figuras.....	X
Capítulo I: Introdução .....	1
1.    Cancro da próstata .....	2
I.    Epidemiologia do cancro da próstata .....	2
II.   Aspetos gerais do cancro da próstata .....	4
III.  Diagnóstico do cancro da próstata .....	6
IV.  Fatores de risco do cancro da próstata .....	9
V.   Principais Causas da progressão do cancro da próstata .....	10
VI.  Principais terapêuticas do Cancro da Próstata.....	13
VII. Recorrência e metastização do cancro da próstata .....	14
2.    Obesidade.....	17
I.    O tecido adiposo .....	18
II.   Obesidade e o cancro da próstata .....	20
III.  As adipocinas .....	23
3.    Objetivo .....	25
Capítulo II: Materiais e Métodos .....	26
1.    Cultura <i>in vitro</i> de células RM1 e 3T3-L1 .....	27
I.    Preparação dos meios de cultura das linhas celulares.....	27
II.   Cultura das RM1 .....	28
III.  Cultura das células 3T3-L1 .....	29
IV.  Diferenciação das células 3T3-L1 em adipócitos .....	29
2.    Determinação da curva de crescimento .....	30
I.    Determinação da curva de crescimento por contagem em Neubauer .....	30



II.	Determinação da curva de crescimento pelo método indireto- XTT .....	30
3.	Avaliação do efeito da insulina e da leptina na proliferação das RM1 .....	30
I.	Avaliação do efeito da insulina na proliferação das células RM1 por contagem em Neubauer .....	30
II.	Avaliação do efeito da insulina na proliferação das células RM1 pelo método do Alamar blue .....	31
III.	Avaliação do efeito da leptina na proliferação das células RM1 pelo método do Alamar blue .....	31
4.	Avaliação da proliferação celular das RM1 em meio condicionado de pré-adipócitos e adipócitos. ....	32
I.	Avaliação direta por contagem em Neubaeur .....	32
II.	Avaliação indireta pelo método do XTT .....	32
5.	Ensaio de migração por dano .....	33
6.	Avaliação da capacidade de invasão das células RM1 .....	34
7.	Avaliação da proliferação das células RM1 e da sua interferência nos adipócitos em co-cultura. ....	35
I.	Avaliação da proliferação das células em co-cultura em sistema de transwells	35
II.	Avaliação da interferência das células RM1 nos adipócitos em co-cultura	36
8.	Análise estatística .....	36
Capítulo III: Resultados .....		37
1.	Curva de crescimento das células RM1 .....	38
2.	Avaliação do efeito da insulina no crescimento celular das RM1 .....	39
3.	Avaliação do efeito da leptina no crescimento celular das RM1 .....	41
4.	Avaliação da proliferação das células RM1 cultivadas com meio condicionado .....	42
I.	Avaliação da proliferação por contagem em camara de Neubaeur .....	42
II.	Avaliação da proliferação pela técnica de XTT .....	44

5.	Migração das células RM1 .....	46
6.	Avaliação da capacidade de invasão das células RM1 .....	49
7.	Avaliação da proliferação das células RM1 em co-cultura com pré- e adipócitos.....	50
8.	Avaliação do efeito das células RM1 no fenótipo dos adipócitos em co-cultura	52
Capítulo IV: Discussão .....		54
Capítulo V: Conclusão.....		63
1.	Prespectivas futuras .....	65
Capítulo VI: Referências bibliográficas .....		66

## Índice de Abreviaturas

### A

AMACR - Alfa-metilacil coenzima A racemase

APN - AP-endonuclease 1

aP2- proteína adipocíticas 2

AR – recetor dos androgénios

### B

BCL-2-linfoma de células B 2

BRCA1 e BRCA2-.proteína de susceptibilidade ao cancro da mama 1 e 2

### C

CaP- cancro da próstata

CDK-cinases dependente da ciclina;

CDKI - inibidor da cinase dependente da ciclina

COX-2 – ciclo-oxigenase 2

CRPC- cancro da próstata resistente a castração

C/EBP- Proteína Estimuladora de Ligação a CCAAT

### D

DHT - Dihidrotestosterona

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DMSO - Dimetilsulfóxido

### E

ECM- matriz extracelular

EGF - fator de crescimento epidermal;

EGFR- recetor do fator de crescimento epidermal

EMT – transição de epitelial para mesenquimal

ERK1/2-cinases reguladoras de sinal extracelular 1/2

ETS – gene de fusão *E-twentysix*

### F

FBS- Soro de bovino Fetal

FGF - fator de crescimento fibroblastos

FGFR- recetor do fator de crescimento de fibroblasto

## **G**

GSTP1- glutathione S transferase P1

## **H**

HIF-1 $\alpha$ - subunidade 1 alfa do fator de indução de hipoxia;

HPCG- gene do cancro da próstata hereditário

Hsp- proteínas de choque térmico

## **I**

IGF-1-fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1,

IGF-1R- recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1;

IL- interleucina

IT- integrinas

## **J**

JAK – cinase Janus

## **K**

KLK2 - proteína humana Calicreína tipo 2

## **M**

MAPK – proteína cinase ativada pela mitogénese

mCRPC – cancro da próstata resistente a castração metastizante

MMP-metaloproteinases da matriz;

## **N**

NF-KB-fator nuclear kB

## **O**

OMS – Organização mundial de saúde

OPG- osteoprotegerina

## **P**

PAI-1- inibidor do ativador de plasminogénio

PBS- tampão fosfato salino

PCA3 -antigénio do cancro da próstata 3

PDGFR- recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas

PI3K/Akt- fosfatidilinositol cinase 3/serina treonina cinase

PPAR- $\gamma$  - recetor gama ativado por proliferador de peroxisoma

PTEN- proteína homóloga da tensina e fosfatase)

PSA – antigénio específico da próstata

PSCA -antigénico das células estaminais da próstata

## **R**

Raf- proteína Raf

RANK -recetor ativador do fator nuclear KB

RANKL -ligando do recetor ativador do fator nuclear K-B

Ras – proteína Ras

Rb -retinoblastoma;

RTK- recetor da tirosina cinase

## **S**

STAT- transdutores de sinal e ativadores de transcrição,

## **T**

TGF $\alpha$ - fator de crescimento tumoral  $\alpha$ ;

TLR-recetores *toll-like*;

TRUS- ultrassonografia trans-rectal

## **U**

uPA- ativador do plasminogénio urocinase;

## **V**

VEGF-fator de crescimento endotelial vascular

VEGFR-recetor do fator de crescimento endotelial vascular

## **W**

WHO – organização mundial de saúde

Wnt- via *wingless-type*

## **X**

XTT – sal de tetrazólio

5 $\alpha$ R- 5alfa-reductase

## **Índice de Figuras**

<b>FIGURA 1-</b> TAXAS DE INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CANCRO DA PRÓSTATA NO MUNDO, POR 100.000, PADRONIZADAS PARA A IDADE (WHO) (JEMAL ET AL., 2011) .....	3
<b>FIGURA 2</b> -PRINCIPAIS VIAS ENVOLVIDAS NO CRESCIMENTO E PROGRESSÃO DO CANCRO DA PRÓSTATA. (ESQ) SUMÁRIO DAS VIAS BIOQUÍMICAS QUE SÃO POTENCIAIS ALVOS PARA A INTERVENÇÃO NO CANCRO DA PRÓSTATA E REDUÇÃO DO RISCO. (DIR) A VIA DE SINALIZAÇÃO DOS RECETOR DOS ANDROGÊNIOS E DAS TIROSINAS CINASES IMPEDIDA POR AGENTES TERAPÊUTICOS PARA INIBIR O CRESCIMENTO CELULAR, A DESREGULAÇÃO DA PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR, E A SOBREVIVÊNCIA CELULAR. OS TRAÇOS T INDICAM ÁREAS EM QUE A INTERVENÇÃO NA DOENÇA PODE SER POSSÍVEL. ....	10
<b>FIGURA 3-</b> POTENCIAIS VIAS DE SINALIZAÇÃO ESTIMULADAS PELAS ADIPOCINAS QUE RELACIONAM A OBESIDADE E O CANCRO. ....	24
<b>FIGURA 4-</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS 3T3-L1. ....	29
<b>FIGURA 5-</b> ILUSTRAÇÃO DO ENSAIO DE MIGRAÇÃO POR DANO. ADAPTADO DE (ECCLES ET AL., 2005).....	33
<b>FIGURA 6-</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO ENSAIO DE INVASÃO, ILUSTRANDO AS VÁRIAS CONDIÇÕES ESTUDADAS. ....	34
<b>FIGURA 7-</b> CURVA DE CRESCIMENTO DAS CÉLULAS RM1 OBTIDA A PARTIR DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CÉLULAS, POR CONTAGEM CELULAR EM CÂMARA DE NEUBAUER.....	38
<b>FIGURA 8</b> – CURVA DE CRESCIMENTO ESTABELECIDO PELO MÉTODO INDIRETO DE XTT ATRAVÉS DA % DE REDUÇÃO DO SAL DE TETRAZÓLIO. A- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM FUNÇÃO DAS ABSORVÂNCIAS OBTIDAS PELA REDUÇÃO DO COMPOSTO. B- AVALIAÇÃO DO CRESCIMENTO EM FORMA DE PERCENTAGEM. ....	39
<b>FIGURA 9-</b> PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS CÉLULAS RM1, COM A CONCENTRAÇÃO DE $4 \times 10^4$ /ML CULTIVADAS NA PRESENÇA DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INSULINA, AVALIADA AO LONGO DO TEMPO POR CONTAGEM DIRETA EM CAMARA DE NEUBAUER. A- EFEITO DA INSULINA NO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DAS DIFERENTES PASSAGENS ESTUDADAS (P12, P13 E P14) B- EFEITO DA INSULINA NO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DA PASSAGEM 14.....	40

<b>FIGURA 10</b> – EFEITO DA INSULINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR, DETERMINADO PELO MÉTODO INDIRETO DO ALAMAR BLUE. A- PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE INSULINA ESTUDADAS, PARA AS TRÊS PASSAGENS ANALISADAS EM CONJUNTO. B- PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 NA PASSAGEM 14, PARA AS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE INSULINA TESTADAS. ....	41
<b>FIGURA 11</b> - EFEITO DA LEPTINA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR, DETERMINADO PELO MÉTODO INDIRETO DO ALAMAR BLUE. A- PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 NAS DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA ESTUDADAS, PARA AS PASSAGENS ANALISADAS EM CONJUNTO. B- PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 NA PASSAGEM 14 PARA AS DIVERSAS CONCENTRAÇÕES DE LEPTINA.....	41
<b>FIGURA 12</b> - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS RM1, NAS PASSAGENS P12, P13 E P14, NA PRESENÇA DE DIFERENTES MEIOS. A- PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS NA PRESENÇA DE MEIO CONDICIONADO DE PRÉ-ADIPÓCITOS COMPARATIVAMENTE COM O CONTROLO. B- PROLIFERAÇÃO CELULAR NA PRESENÇA DE MEIO CONDICIONADO DOS ADIPÓCITOS DE 24 E 48 HORAS, EM RELAÇÃO AO CONTROLO. C- PROLIFERAÇÃO CELULAR NOS MEIOS CONDICIONADOS DE ADIPÓCITOS (1 E 2 DIAS) COMPARATIVAMENTE COM O MEIO DOS PRÉ-ADIPÓCITOS (* $p<0.05$ ). ....	42
<b>FIGURA 13</b> - PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 DA PASSAGEM 14, NA PRESENÇA DE DIFERENTES MEIOS CONDICIONADOS. A- PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS NA PRESENÇA DE MEIO CONDICIONADO DE PRÉ-ADIPÓCITOS COMPARATIVAMENTE COM O CONTROLO. B- PROLIFERAÇÃO CELULAR NA PRESENÇA DE MEIO CONDICIONADO DOS ADIPÓCITOS DE 24 E 48 HORAS, EM RELAÇÃO AO CONTROLO. C- PROLIFERAÇÃO CELULAR PARA OS TRÊS MEIOS TESTADOS (* $p<0.05$ ).....	43
<b>FIGURA 14</b> – ILUSTRAÇÃO DO CRESCIMENTO DAS CÉLULAS DE CARCINOMA DA PRÓSTATA NAS DIFERENTES CONDIÇÕES TESTADAS. A- CTRL MCPA; B- MCPA; C- CTRL MCA; D- MCA; E- MCA DOIS DIAS (100X). ....	44
<b>FIGURA 15</b> - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS RM1 AVALIADO PELO MÉTODO DO XTT CULTIVADAS COM DIFERENTES MEIOS CONDICIONADOS. A- EFEITO DO MEIO CONDICIONADO DOS PRÉ-ADIPÓCITOS (MCPA) NA PROLIFERAÇÃO CELULAR. B- EFEITO DO MEIO CONDICIONADOS DOS ADIPÓCITOS (MCA) DE 24H E 48H NO CRESCIMENTO CELULAR. C- EFEITO DO MEIO MCA (1 E 2 DIAS) EM COMPARAÇÃO COM O MEIO MCPA (* $p<0.05$ ; *** $p<0.001$ ). ....	45
<b>FIGURA 16</b> - PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS RM1 DA PASSAGEM 14 AVALIADO PELO MÉTODO DO XTT CULTIVADAS COM DIFERENTES MEIOS CONDICIONADOS. A- EFEITO DO MEIO MCPA NA PROLIFERAÇÃO CELULAR. B- EFEITO DO MEIO MCA DE 24H E 48H NO CRESCIMENTO CELULAR. C- EFEITO DO MEIO MCA EM COMPARAÇÃO COM O MEIO MCPA (* $p<0.05$ ; ** $p<0.01$ ; *** $p<0.001$ ). ....	46



<b>FIGURA 17-</b> ÁREA DE PREENCHIMENTO DO TRAÇO PELAS CÉLULAS RM1 DAS DIFERENTES PASSAGENS ESTUDADAS, NA PRESENÇA DE DIFERENTES MEIOS CONDICIONADOS (* $P<0.05$ ).....	47
<b>FIGURA 18</b> – IMAGENS ILUSTRATIVAS DO RISCO E DA PERCENTAGEM DE OCUPAÇÃO APÓS 24H, NAS DIFERENTES CONDIÇÕES TESTADAS. A - CONTROLO; A' - CONTROLO 24H; B - MCPA 0H; B' – MCPA 24H; C- MCA 0H; C' - MCA 24H. ....	48
<b>FIGURA 19</b> – NÚMERO DE CÉLULAS PRESENTES NA MEMBRANA DE MATRIGEL DOS ENSAIOS DE INVASÃO, NAS DIFERENTES CONDIÇÕES AFERIDAS. A- CÉLULAS QUE INVADIRAM A MEMBRANA CULTIVADAS NA PRESENÇA DE PRÉ-ADIPÓCITOS E O SEU CONTROLO. B- CÉLULAS QUE INVADIRAM A MEMBRANA, NA PRESENÇA DE ADIPÓCITOS E SEU RESPECTIVO CONTROLO (* $P<0.05$ ). ....	49
<b>FIGURA 20-</b> INVASÃO DA MEMBRANA DE MATRIGEL PELAS CÉLULAS RM1 NAS DIFERENTES CONDIÇÕES.....	50
<b>FIGURA 21</b> – PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 AVALIADA POR CITOMETRIA DE FLUXO. A- PROLIFERAÇÃO CELULAR DAS RM1 EM CO-CULTURA COM PRÉ-ADIPÓCITOS COMPARATIVAMENTE COM O CONTROLO. B- PROLIFERAÇÃO DAS RM1 CO-CULTIVADAS COM OS ADIPÓCITOS EM RELAÇÃO AO SEU CONTROLO. C- PROLIFERAÇÃO DAS CÉLULAS NAS CO-CULTURAS COM OS DOIS TIPOS CELULARES (** $P<0.01$ ; *** $P<0.001$ ).....	51
<b>FIGURA 22</b> – CÉLULAS 3T3-L1 DIFERENCIADAS, EVIDENCIANDO AS GOTÍCULAS LIPÍDICAS (200x). ....	52
<b>FIGURA 23</b> – EFEITO DAS CÉLULAS RM1 NOS ADIPÓCITOS. A- ADIPÓCITOS 3T3-L1 DIFERENCIADOS, ANTES DA CO-CULTURA COM RM1; B- ASPETO DOS ADIPÓCITOS APÓS 24H EM CO-CULTURA (100x).....	53
<b>FIGURA 24</b> – EFEITO DAS RM1 NOS ADIPÓCITOS ANTES (A) E APÓS 48HORAS (B) EM CO-CULTURA (100x)....	53

## **Capítulo I: Introdução**

## **1. Cancro da próstata**

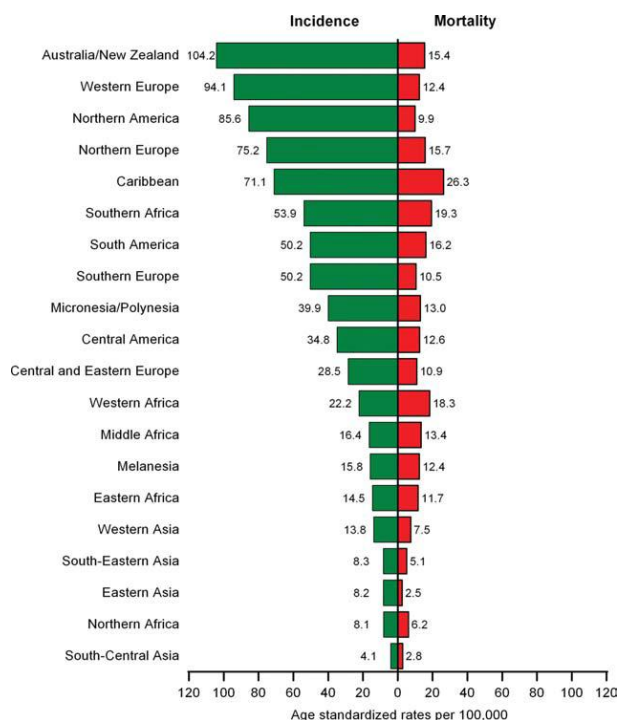
O cancro é a principal causa de morte nos países economicamente desenvolvidos e a segunda principal causa de morte nos países em desenvolvimento (Jemal et al., 2011).

A incidência do cancro está a aumentar nos países em desenvolvimento como resultado do crescimento e envelhecimento da população, bem como, pelo aumento da adoção de estilos de vida associados ao cancro, como tabagismo, inatividade física, e dietas ocidentalizadas (Jemal et al., 2011, Ferlay et al., 2010).

### **I. Epidemiologia do cancro da próstata**

O cancro da próstata é o segundo cancro mais frequente, bem como a sexta maior causa de morte por cancro mundial nos homens (Ferlay et al., 2010, Verma et al., 2011). Sendo o segundo cancro mais diagnosticado, a seguir ao cancro da pele, é a segunda principal causa de morte por cancro nos Estados Unidos, depois do cancro do pulmão (Brawley, 2012, Braun et al., 2012).

À escala global, a incidência e mortalidade do carcinoma da próstata apresenta uma diferença bastante clara entre os países desenvolvidos e os países em desenvolvimento, com os países desenvolvidos a apresentarem a maior taxa de incidência e mortalidade (Ferlay et al., 2010, Robinson, 2013) (Figura1). Deste modo, sabe-se que a população Afro-americana possui a maior incidência, e a população pertencente ao continente asiático tem a menor incidência. Esta diferença nas taxas de incidência pode dever-se a diferenças no acesso aos sistemas de saúde, na disponibilidade de meios de triagem, nomeadamente nos testes de diagnóstico, como o teste do antígeno específico da próstata (Hsing and Chokkalingam, 2006). Esta divergência na taxa incidência pode ainda estar relacionada com diferentes condições ambientais (exposição, dieta), variabilidade na componente genética e no estado fisiológico (como por exemplo os níveis hormonais) (Crawford, 2009, Ankur M. Manvar, 2013) .



**Figura 1-** Taxas de incidência e mortalidade do cancro da próstata no mundo, por 100.000, padronizadas para a idade (WHO) (Jemal et al., 2011)

Em relação a taxa de mortalidade mundial, esta é reflexo da taxa de incidência, com os países ocidentais de maior taxa de incidência a apresentarem também maior mortalidade em relação aos países com menor risco, mas com menor variação entre países (Jemal et al., 2011) (Figural). O risco de mortalidade global por cancro da próstata é de, aproximadamente, uma pessoa em trinta e cinco (Sardana and Diamandis, 2012) .

No mundo, são diagnosticados mais de 660 000 novos casos por ano, o que representa 10% de todos os novos casos de cancros no sexo masculino (Arcangeli et al., 2012). De acordo com as estimativas da American Cancer Society, em 2011, foram diagnosticados com cancro da próstata 240,980 homens e cerca 34, 000 faleceram desta doença (Fowke et al., 2012). Na europa, o cancro da próstata também é a neoplasia mais comum no sexo masculino, e estima-se que ocorreram 382,000 casos e quase 90 mil mortes em 2008, tornando esta neoplasia a terceira causa de morte mais comum por cancro nos homens, depois do cancro do pulmão e do cancro colorretal (Bray et al., 2010).

Em Portugal, segundo dados do Portal de Oncologia Português o cancro da próstata também é o mais frequente, e existem cerca de 4.000 novos casos e aproximadamente 1800 mortes por ano, sendo responsável por cerca 10% da mortalidade por cancro, e por cerca

de 3.5% de todas as mortes. À semelhança da Europa, o cancro da próstata, em Portugal, também é a terceira causa de morte, a seguir ao cancro do pulmão e do colón (POP, 2013).

## **II. Aspetos gerais do cancro da próstata**

O carcinoma da próstata é conhecido por ser uma doença dos homens idosos, ter um caráter indolente, com um desenvolvimento lento, e pode ser precedido por lesões displásicas durante muitos anos, ou mesmo décadas. De acordo com extrapolações de estudos de autópsias, a maioria dos homens teria cancro se vivesse até aos 100 anos, e tendo em conta o número de cancros da próstata encontrados acidentalmente em autópsias, um pequeno cancro da próstata localizado pode permanecer desconhecido durante muito tempo, antes de evoluir para uma doença clinicamente significativa (Leitzmann and Rohrmann, 2012). Apesar do seu caráter indolente, sabe-se que a probabilidade da doença progredir para uma doença mortal e metastática aumenta com o tempo de exposição à doença, mesmo nos tumores que são diagnosticados numa fase inicial (Johansson et al., 2004), sendo que, cerca de 30% dos tumores evolui agressivamente (Koochekpour, 2011)

A etiologia do cancro da próstata permanece largamente desconhecida, apesar da sua elevada morbilidade (Braun et al., 2012). Além disso, esta neoplasia é heterogénea tanto a nível morfológico como clínico, o que dificulta a sua compreensão (Crawford, 2009).

A próstata é uma glândula exócrina, em forma de castanha, que compõe o sistema reprodutor dos indivíduos do sexo masculino, responsável pela secreção e síntese de componentes orgânicos e inorgânicos para o plasma seminal, que nutrem e protegem o esperma (Miller and Torkko, 2001). Esta glândula é delimitada por uma capsula fibrosa, e uma glândula tubuloalveolar, envolve a uretra, está localizada entre a bexiga e o diafragma pélvico, e ao lado das vesículas seminais. A próstata é composta por ácinos e ductos revestidos por uma bicamada epitelial de células epiteliais basais, células epiteliais luminais secretoras e células neuroendócrinas rodeados por estroma fibromuscular. O estroma fibromuscular é composto por células de músculo liso, uma matriz de colagénio, com nervos, vasos linfáticos e sanguíneos embebidos (Hammarsten, 2008). As células epiteliais luminais secretoras são responsáveis pela secreção de vários componentes para o plasma seminal incluído a fosfatase ácida prostática e antígeno específico da próstata (PSA) (Miller and Torkko, 2001).

O tamanho da próstata permanece relativamente constante até a puberdade (1-2g), a partir dessa fase aumenta, atingindo, aproximadamente os 20-25g na idade adulta (Miller and Torkko, 2001).

Nos seres humanos, esta glândula possui 4 regiões glandulares distintas, que são designadas por zona periférica, transição, central e fibro-muscular. As diferentes zonas estão associadas a diferentes patologias, sendo a zona de transição a zona de desenvolvimento preferencial das hiperplasias benignas, e a zona periférica aquela em que a maioria dos cancros da próstata (cerca de 70%) se desenvolve. Cerca de 10-15% dos casos cancro da próstata desenvolvem-se na zona de transição e 15-20% na zona central (Crawford, 2009).

As principais condições patológicas que se podem encontrar na próstata são a prostatite, hiperplasia benigna da próstata e o cancro da próstata (Miller and Torkko, 2001). A prostatite é uma inflamação crónica da próstata, causada na maioria das vezes por uma infeção. A hiperplasia benigna da próstata é caracterizada por uma hiperplasia do tecido prostático, ou seja um crescimento anormal de células prostáticas benignas (Miller and Torkko, 2001). O cancro da próstata é a patologia, em que células malignas formam glândulas muito ou pouco diferenciadas, consoante o grau de diferenciação das referidas células malignas (Hammarsten, 2008). Estão ainda descritas duas condições patológicas pré-cancerosas, a neoplasia intraepitelial prostática e a hiperplasia adenomatosa atípica, que de acordo com alguns especialistas poderão ser precursores do carcinoma da próstata (Miller and Torkko, 2001) .

Cerca de 95% de todos os cancros da próstata são adenocarcinomas, e a maioria deles são do tipo convencional acinar. Existem outros tipos de cancro da próstata (sarcomas, carcinomas de pequenas células, e carcinomas de epitélio de transição), mas são muito raros (Robinson, 2013).

O carcinoma da próstata pode ser classificado em localizado (quando se encontrar circunscrito dentro da capsula), localmente avançado (se já estiver propagado para fora da cápsula, mas não apresentar ainda metástases) ou avançado (quando apresenta metástases) (Hammarsten, 2008).

Tipicamente, este tumor inicia-se com lesões androgénio dependentes, contudo frequentemente evolui para lesões androgénio independentes, com progressão para um

estadio mais avançado e mais agressivo, conduzindo a um pior prognóstico, doença incurável e até morte (Koochekpour, 2011).

À semelhança do que acontece noutros tumores, no carcinoma da próstata quanto mais diferenciadas forem as células tumorais (ou seja, mais parecidas com as células normais), menos agressivo será o tumor, e quanto menos diferenciadas forem (menos idênticas as células normais da próstata), mais agressivo será o tumor, e por conseguinte mais rápida a sua evolução. Deste modo, tumores de baixo grau (tumores moderadamente ou altamente diferenciados) tendem a ter um percurso mais longo, ao contrário de alguns tumores de elevado grau que progridem muito rapidamente para metastização. Além disso, de acordo com estudos efetuados, tumores de elevado grau de diferenciação apresentaram uma taxa de sobrevida aos 10 anos de 87%, enquanto os tumores pouco diferenciados foram associados com uma taxa de sobrevida de 34%. Do mesmo modo, a taxa de sobrevivência livre de metástases aos 5-10 anos foi maior nos homens com tumores de baixo grau (ou seja com maior diferenciação). No diagnóstico, quando estão presentes tumores de baixo grau existe uma baixa taxa de progressão e de morte associada (Crawford, 2009).

Outro aspeto que é característico do cancro da próstata prende-se com o facto de muitos dos casos de cancro serem multifocais, isto é, apresentam vários clones malignos diferentes, ou por outras palavras apresentam tumores com diferentes graus de evolução/diferenciação, geneticamente distintos, distribuídos pelas diferentes zonas anatómicas), o que dificulta o seu diagnóstico (Miller and Torkko, 2001, Crawford, 2009, Hammarsten, 2008).

Embora o cancro da próstata seja em grande parte uma doença diagnosticada em homens mais velhos (com mais de 65 anos), a introdução do rastreio com o doseamento do antígeno específico da próstata (PSA) tem aumentado o risco de diagnóstico desta neoplasia em homens nas faixas etárias dos 40 e 50 anos. As taxas de incidência e de sobrevida aos 5 anos foram fortemente influenciadas pela introdução do rastreio do PSA, contudo este efeito foi mais reduzido nas taxas de mortalidade (Brawley, 2012).

### **III. Diagnóstico do cancro da próstata**

Historicamente, o diagnóstico do cancro da próstata foi despoletado pela deteção de anormalidades palpáveis ao exame do toque rectal (Miller and Torkko, 2001).

Atualmente, o antígeno específico da próstata (PSA) é o biomarcador mais usado para o diagnóstico do cancro da próstata juntamente com o exame rectal digital (Azevedo et al., 2011). O PSA é uma protease de serina que é específica da próstata, mas não do cancro da próstata. Este encontra-se tipicamente, no plasma ligado a inibidores enzimáticos (Miller and Torkko, 2001). Este teste baseia-se na deteção do antígeno específico da próstata em circulação, em concentrações mais elevadas do que o normal, o que indica que houve um desarranjo na arquitetura dos tecidos prostáticos, que permitiu a libertação do PSA para circulação (Sardana and Diamandis, 2012).

O valor de PSA normal no sangue encontra-se na gama dos 0-3 ng/ml (Hammarsten, 2008). Valores de PSA superiores a 4ng/ml são indicativos de patologia da próstata, sendo usado o valor 4 ng/ml como valor limite para a determinação do cancro da próstata. Contudo, é necessário fazer exames auxiliares para averiguar se a patologia em questão é um cancro ou apenas de uma hiperplasia benigna da próstata, uma vez que valores acima de 10 ng/ml é que constituem um potencial risco do paciente ter cancro (Hammarsten, 2008). Além disso, estudos demostraram que existe uma elevada prevalência do cancro da próstata em indivíduos com valores inferiores a 4 ng/ml, o que indica que o valor de PSA para diagnóstico de cancro não deverá ser um valor fixo (Anderson, 2013).

O teste do PSA permite detetar anomalias na próstata, como prostatite, hiperplasia benigna da próstata ou tumor, mas não é específico para nenhuma destas condições, assim como também não permite distinguir tumores indolentes de agressivos, ou seja, não dá para prever a progressão do tumor para um estadio de metastização (Sardana and Diamandis, 2012).

Deste modo, embora o teste do PSA tenha alta sensibilidade, tem uma especificidade bastante baixa, que em combinação com a natureza assintomática e o crescimento lento deste tipo de tumores, levou a que muitos homens fossem hiperdiagnosticados e submetidos a cirurgias ou tratamentos com efeitos secundários adversos desnecessários. O que tornou essencial a pesquisa de novos biomarcadores para melhorar a identificação de homens em risco de ter esta neoplasia e para prever o comportamento do cancro da próstata (Sardana and Diamandis, 2012).

Outros parâmetros relacionados com o PSA, como a percentagem de PSA livre, a velocidade do PSA e a densidade de PSA estão a ser aplicados na clinica para auxiliar o



diagnóstico (Jenster, 2013). Além disso, novos marcadores para o cancro da próstata estão em fase de desenvolvimento como é o caso da proteína Calicreína humana tipo 2 (hK2/KLK2), antígeno do cancro da próstata 3 (PCA3), o antígeno das células estaminais da próstata (PSCA), a glutatona S transferase P1 (GSTP1), o gene de fusão *E-twenty-six* (ETS), proteína AMACR (Petricoin, 2013, William G. Nelson, 2013, Hideaki Miyake, 2013, Rajesh Nair, 2013, Jenster, 2013)

Outros meios de diagnóstico são a ultrassonografia trans-rectal (TRUS) e a biopsia (Rottenberg, 2013). O diagnóstico do cancro da próstata deve ser confirmado, após os exames digitais e bioquímicos por uma biopsia, antes de definir a terapia (Miller and Torkko, 2001).

O teste de PSA é realizado não só para diagnóstico, mas também para monitorizar e avaliar o efeito do tratamento, sendo portanto comum a sua realização após a prostatectomia. No caso de se verificar recorrência bioquímica, ou seja, aumento dos níveis de PSA em circulação, pode ser indicativo de que a terapêutica não foi eficaz para o combate do CaP (Hegarty, 2013).

Por forma a desenhar uma modalidade terapêutica e mais eficazmente tratar o cancro da próstata, é fundamental ter toda a informação possível acerca do estadio clínico e histológico do tumor, uma vez que estes nos dão informações importantes sobre o potencial maligno das neoplasias, e portanto permite melhor estabelecer a abordagem terapêutica (Miller and Torkko, 2001, Rottenberg, 2013, Henderson, 2013).

Para o carcinoma da próstata o sistema padrão de classificação histológica, estabelecido internacionalmente, é o sistema *score Gleason*. Esta classificação é feita em função das características celulares e histológicas que constituem o tumor. As células tumorais que sejam mais diferenciadas, ou seja mais parecidas com as da próstata normal são classificadas de grau 1, enquanto as células que sejam menos diferenciadas são classificadas com o grau máximo 5. Depois é feita avaliação do grau dos dois tipos celulares mais predominantes, e o *score de Gleason* é determinado pela soma desses dois graus, e varia de 2 a 10, sendo que o grau do padrão mais comum é adicionado ao grau do segundo padrão mais comum. Os scores inferiores a 6 significam um melhor prognóstico, enquanto que os scores de 8-10 traduzem tumores mais agressivos, pois são os que tem maior predomínio de células indiferenciadas (Robinson, 2013) .

O sistema de estadiamento TNM é o método usado habitualmente para o estadiamento clínico. Este está dividido em três principais áreas: avaliação do tumor primário (“T”), avaliação do envolvimento dos gânglios linfáticos próximos do tumor (“N”) e avaliação da presença de metástases à distância (“M”) (Henderson, 2013).

O estadio do tumor e o *score* de Gleason, continuam a ser os fatores de prognóstico mais importantes no cancro da próstata (Braun et al., 2012, Jr, 2013). Ao passo que os níveis de PSA e o grau do tumor são os indicadores mais importantes da significância clínica do cancro da próstata, da probabilidade de progressão e da necessidade de tratamento (Hegarty, 2013, Valérie Fonteyne, 2013).

#### **IV. Fatores de risco do cancro da próstata**

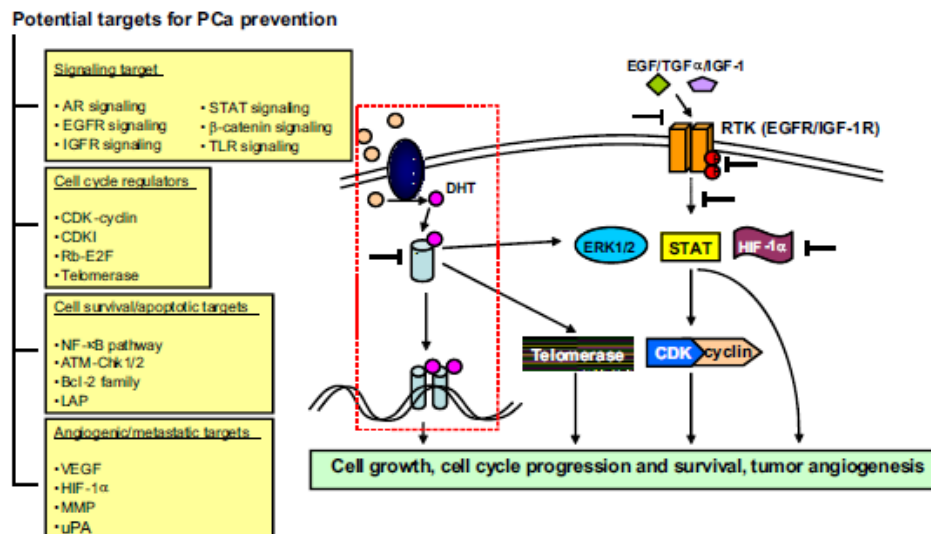
Os principais fatores de risco descritos para este tipo de cancro da próstata são fatores de categoria demográfica relacionados com a idade, a raça/ etnia e a localização e fatores de risco relacionados com o estilo de vida (sedentarismo, dieta, consumo de álcool e tabaco) (Hsing and Chokkalingam, 2006). Dentro dos fatores de risco de categoria demográfica sabe-se que homens mais velhos e de raça negra têm maior probabilidade de desenvolver este tipo de cancro, com exceção dos indivíduos com cancro hereditário que normalmente são mais jovens que os que tem cancro esporádico (Ntais et al., 2003). Além disso, sabe-se que a incidência do cancro da próstata aumenta dramaticamente com a idade, passando da frequência de 1 em 10.000 indivíduos em idade inferior a 40 anos, para 1 em 8 indivíduos em idades superiores a 80 anos (Valérie Fonteyne, 2013). Em relação aos fatores relacionados com o estilo de vida sabe-se que a dieta parece ter um papel neste cancro, mas o mecanismo pelo qual exerce esse papel não está ainda bem estabelecido. Apesar disso, está descrito que dietas hipercalóricas aumentam o risco de progressão do tumor, enquanto as dietas hipocalóricas conferem proteção (Katz, 2013b). Além disso, homens obesos apresentam um risco mais elevado de serem diagnosticados com cancro da próstata de elevado grau de agressividade (Brawley, 2012). Relativamente aos fatores comportamentais temos que o consumo de tabaco aumenta o risco de mortalidade, enquanto o consumo de álcool aumenta o risco de desenvolver a doença (Leitzmann and Rohrmann, 2012).

Outro fator de risco é a história familiar de cancro da próstata, o que indica que fatores genéticos, como a presença de determinados genes (p.e. gene do cancro da próstata hereditário-HPCG, o gene do cancro da mama 1 e 2 (BRCA1 e BRCA2), variações

genéticas em genes supressores tumorais, oncogénese e genes relacionados com o ciclo celular e angiogénese, também parecem ter um papel importante no desenvolvimento da doença (Koochekpour, 2011). Alterações dos níveis hormonais, como os androgénios e da relação estrogénios/androgénios (Azevedo et al., 2011), assim como dos níveis de insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) também têm sido sugeridos como potenciais fatores de risco (Brawley, 2012, Hsing and Chokkalingam, 2006). Em suma, a patogénese do cancro da próstata provavelmente envolve interação entre fatores ambientais e genéticos (Hsing and Chokkalingam, 2006).

## V. Principais Causas da progressão do cancro da próstata

Existem inúmeros mecanismos moleculares descritos, que levam ao desenvolvimento e progressão do cancro da próstata como podemos ver na figura 2 (Crawford, 2009).



**Figura 2** -Principais vias envolvidas no crescimento e progressão do cancro da próstata. (Esq) sumário das vias bioquímicas que são potenciais alvos para a intervenção no cancro da próstata e redução do risco. (Dir) A via de sinalização dos recetor dos androgénios e das tirosinas cinases impedida por agentes terapêuticos para inibir o crescimento celular, a desregulação da progressão do ciclo celular, e a sobrevivência celular. Os traços T indicam áreas em que a intervenção na doença pode ser possível.

5 $\alpha$ R, 5alfa redutase; CDK, cinases dependente da ciclina; CDKI, inibidor da cinases dependente da ciclina; EGF, fator de crescimento epidermal; EGFR, recetor do fator de crescimento epidermal; ERK1/2, cinases reguladoras de sinal extracelular 1/2; HIF-1 $\alpha$ , subunidade 1 alfa do fator de indução de hipoxia; IGF-1, fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IGF-1R, recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IGFR, fator de crescimento semelhante a insulina; LAP, aminopeptidase de leucina; MMP, metaloproteínas da matriz; NF- $\kappa$ B, fator nuclear  $\kappa$ B; Rb-E2F, retinoblastoma; RTK, recetor de tipo tirosina cinase; STAT, transdutor

de sinal e ativador da transcrição 3, TGF $\alpha$ , fator de crescimento tumoral  $\alpha$ ; TLR, recetores *toll-like*; uPA, urocinase ativador do plasminogénio; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial (Crawford, 2009).

No cancro da próstata estão constitutivamente ativas vias de sinalização, o que leva a um crescimento e progressão persistente do mesmo. Estes eventos biológicos neoplásicos são regulados por uma ativação ou desativação ou expressão e supressão sequencial de muitas moléculas, que podem ser potenciais alvos terapêuticos para combater o crescimento e progressão do tumor (Singh and Agarwal, 2006).

Existem várias vias envolvidas no processo de progressão do CaP, sendo as principais a via da proteína cinase ativada pela mitogénese (MAPK) Ras/Raf/MAPK, a via da cinase PI3 (PI3K)/Akt, a via da cinase *Janus* / STAT3 e a via *wingless-type* (Wnt) que pela ação de sinais mitogénico e sobrevivência estimulam esta progressão e desenvolvimento das células tumorais (Singh and Agarwal, 2006).

De entre os vários alvos moleculares descritos como intervenientes neste processo de progressão e desenvolvimento tumoral, podemos salientar o recetor dos androgénios (RA), um dos principais responsáveis pelo crescimento tumoral, pelo desenvolvimento de resistência hormonal e por recidivas da doença. Este é ativado pela ligação da dihidrotestosterona (DHT), que provém da conversão da testosterona pela enzima 5 $\alpha$ -redutase (5-AR), o que conduz à sua translocação nuclear para ativação de genes que vão favorecer o desenvolvimento do tumor (Crawford, 2009). Deste modo, tanto os recetores dos androgénios como a enzima 5-AR são potenciais alvos para tratamento do cancro da próstata (Singh and Agarwal, 2006).

Os recetores membranares do tipo tirosina cinases como o recetor do fator de crescimento epidermal (EGFR), o recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1 (IGF-IR), o recetor do fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) e o recetor do fator de crescimento fibroblasto (FGFR) são outras moléculas que estão descritas como intervenientes nesta progressão tumoral. Estes recetores encontram-se altamente expressos no CaP, e a sua expressão está associada a um pior prognóstico, progressão da doença para um estadio mais avançado (Neal, 2013). Este efeito é conseguido em parte pela ativação das vias de sinalização descritas anteriormente (Singh and Agarwal, 2006).

Estão ainda descritas uma série de moléculas responsáveis pela regulação de importantes processos biológicos, como regulação do ciclo celular, apoptose, angiogénese

e adesão celular, referenciadas como intervenientes neste processo de desenvolvimento e progressão do cancro da próstata (Singh and Agarwal, 2006).

As ciclinas, as cinases dependentes das ciclinas, os inibidores das cinases dependentes das ciclinas (como p21, p27, p57), a telomerase, e a proteína 100 do retinoblastoma (Rb/p100) são moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular (por mecanismos de estimulação/supressão), e que intervêm no processo de progressão tumoral. As moléculas estimuladoras têm uma expressão elevada no cancro da próstata, ao passo que as inibitórias apresentam uma expressão reduzida (Singh and Agarwal, 2006).

Dentro dos fatores relacionados com a sobrevivência e apoptose são de salientar o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), o gene anti-apoptótico BCL-2, e o gene supressor tumoral PTEN (homólogo da tensina e fosfatase). Os primeiros estão relacionados com a inibição da apoptose, e têm uma expressão elevada no carcinoma da próstata (Singh and Agarwal, 2006), enquanto o último, o PTEN, como estimula a apoptose, tem uma expressão baixa, o que também favorece a progressão do cancro.

Os principais fatores envolvidos na angiogénese que estão relacionados com o desenvolvimento tumoral são o VEGF, IGF-I, HIF-1 (fator de indução de hipoxia 1), (ciclo-oxigenase-2) COX-2, (interleucina-8) IL-8. Além disso, são estimuladores de angiogénese, que é um mecanismo biológico fundamental para o crescimento e metastização de tumores sólidos, como é o caso do cancro da próstata. Estes fatores são secretados pelas células tumorais, em resposta a sinais mitogénicos, que vão atuar sobre as células endoteliais para a formação *de novo* de vasos (Singh and Agarwal, 2006). Além disso, alguns destes fatores como HIF-1 parecem além de favorecer a metastização, contribuir para uma resistência na resposta a quimioterapia nos cancros da próstata resistentes à castração (Ranasinghe et al., 2013).

Em relação aos fatores responsáveis pela adesão celular, temos como principais intervenientes a proteína  $\beta$ -catenina, a urocinase ativadora do plasminogénio (uPA), as integrinas (ITs) e as metaloproteinases (MMP) 2 e 9, uma vez que medeiam o processo de invasão das células tumorais, promovendo assim o desenvolvimento e metastização do tumor (Singh and Agarwal, 2006).

Proteínas relacionadas com o *stress* celular, como as proteínas de choque térmico (*heat-shock proteins*, Hsp 27 e 90), também estão relacionadas com o desenvolvimento e

progressão do tumor, porque interagem com várias moléculas supracitadas (Francois Lamoureux, 2013).

Todos estes fatores encontram-se alterados e portanto a funcionar de forma incorreta, potenciando o desenvolvimento tumoral. Deste modo, constituem potenciais alvos terapêuticos para o combate desta neoplasia (Singh and Agarwal, 2006).

De acordo com estudos efetuados, a inflamação parece estar relacionada com o desenvolvimento do cancro da próstata, uma vez que muitas proteínas associadas a inflamação, como o fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e as interleucinas 1, 6 e 11 (IL-1, IL-6 e IL-11) estão referenciados como intervenientes no processo de progressão tumoral (Kwon et al., 2011, Francois Lamoureux, 2013, Kumar, 2013, Petricoin, 2013). Os efeitos pro-tumorigénicos da inflamação crónica incluem danos no DNA, aumento da proliferação, inibição de apoptose e estimulação da angiogénese, sendo que todos estes mecanismos potenciam o desenvolvimento tumoral (Kwon et al., 2011).

Além disso, este microambiente com imensas citocinas e fatores de crescimento altera o comportamento biológico de algumas células imunológicas, favorecendo a progressão tumoral (Sonya Vasto, 2013) .

O microambiente tumoral parece ter um papel muito ativo na progressão tumoral, uma vez que a interação entre células tumorais e células estromais desencadeiam mecanismos como a remodelação da matriz extracelular (ECM) que potencia a invasão do tumor, assim como a libertação de fatores de crescimento necessários para o crescimento das células independentes dos androgénios, e desenvolvimento da angiogénese, que vai promover a progressão do tumor. Além disso, esta interação entre as células tumorais e o estroma parece afetar a resposta imune ao tumor, além de potenciar o seu crescimento e invasão. Deste modo, terapias que passem pela inibição desta comunicação entre as células epiteliais tumorais e as células do estroma poderão ter um forte impacto no combate desta neoplasia (Corn, 2012).

## **VI. Principais terapêuticas do Cancro da Próstata**

O tratamento do cancro da próstata varia consoante a idade, prognóstico, a presença de co-morbilidade e o estadio do tumor (Hammarsten, 2008).

Atualmente existem diversas opções terapêuticas para combater o cancro da próstata, das quais fazem parte a prostatectomia radical, a quimioterapia, a radioterapia

(com todas as suas vertentes, braquiterapia, radioterapia externa, terapia de feixe de prótons), a imunoterapia, crioterapia, entre outras (Petricoin, 2013, Jr, 2013).

A terapia hormonal é das terapêuticas mais usadas no tratamento desta neoplasia, uma vez que as células tumorais da próstata crescem em resposta a hormonas, mais concretamente aos androgénios (Koochekpour, 2011). A terapia hormonal usada para inativar os recetores destas hormonas, é efetuada para bloquear a ativação do recetor dos androgénios mediada pela ligação do androgénio, através da supressão da produção dos androgénios ou por agentes farmacológicos que interajam com a ligação do recetor ligando, o que vai ajudar a combater o efeito de proliferação sobre as células tumorais (Nelson, 2013) .

Além da terapêutica hormonal de inativação dos androgénios, muitos outros agentes terapêuticos estão a ser desenvolvidos para combater a progressão tumoral mediada por outros alvos moleculares, como inibidores dos fatores angiogénicos, inibidores do AR, entre muitos outros (Corn, 2012).

De acordo com muitos investigadores, a quimioprevenção do cancro também pode ser considerado uma forma de tratamento do cancro (Tindall, 2013, Hamid, 2013). Esta inclui a prevenção, supressão e/ou reversão das fases precoces e tardias do crescimento do cancro, e por fim o desenvolvimento através de agentes naturais não tóxicos ou sintéticos. Os agentes quimiopreventivos, quando usados com outras terapias, mostraram melhorar a resposta a estas terapias, e portanto constituem uma possível alternativa na terapia combinada no controlo do CaP (Singh and Agarwal, 2006).

Contudo, como muitas das vezes o tumor recidiva e torna-se androgénio independente (CRPC), e as células tumorais crescem apesar da inativação dos androgénios e adquirem um fenótipo mais agressivo, neste caso as opções terapêuticas eficazes são escassas, resumindo-se cuidados paliativos e não curativos (Koochekpour, 2011).

## **VII. Recorrência e metastização do cancro da próstata**

O cancro da próstata é caracterizado por ter uma elevada taxa de recidiva após o tratamento cirúrgico com prostatectomia radical ou com terapias hormonais para inativar os androgénios. Cerca de 30-50% dos homens apresentam recorrência bioquímica nos 10 subsequentes ao primeiro tratamento, com desenvolvimento de metástases ósseas (Tindall, 2013, Francois Lamoureux, 2013, Casey K. Ng, 2013).

Quando recidiva após terapia hormonal o tumor torna-se resistente à castração (CRPC), com uma enorme capacidade metastizante, denominando-se mCRPC que é a forma letal do CaP, cerca de 84% dos pacientes com metástases apresentam CRPC (Ranasinghe et al., 2013).

Estão descritos vários mecanismos explicativos para esta resistência das células tumorais à terapia hormonal e do desenvolvimento do cancro da próstata resistente a castração, dos quais podemos salientar a hipersensibilidade das células tumorais ao estímulo dos androgénios promovido por uma reativação dos recetores dos androgénios (causado por uma ampliação ou sobreexpressão, ou mesmo mutações do gene do recetor e por uma ativação independente do ligando), assim como a conversão dos esteróides adrenais em testosterona por enzimas presentes nestas células resistentes a castração (Leibowitz-Amit and Joshua, 2012, Nelson, 2013, Francois Lamoureux, 2013). Portanto, é de extrema importância desenvolver novas terapias que inativem os recetores dos androgénios, assim como bloqueadores da biossíntese autócrina e paracrina da testosterona nas células tumorais, para melhorar a eficácia da terapêutica (Parray et al., 2012).

Outro dos mecanismos que parece estar envolvido nesta resistência é o uso de vias alternativas ao AR como é o caso das vias que envolvem fatores de crescimento (VEGF, EGF) promovendo o seu crescimento e sobrevivência, com estudos a demonstrar que a inativação destas vias em células tumorais independentes dos androgénios parece suprimir o seu crescimento (Hammarsten, 2008).

O cancro da próstata resistente à castração além da capacidade de crescer independentemente dos andrógenos apresenta uma enorme capacidade metastizante, especialmente no tecido ósseo. As metástases ósseas constituem a principal causa de morbilidade e mortalidade por cancro da próstata, e diminuem a taxa de sobrevivência aos 5 anos em aproximadamente 100% (nos doentes com doença localizada e sem metástases) para cerca de 25% (em doentes com metástases ósseas), conferem uma sobrevida média de apenas 40 meses (Corn, 2012) e cerca de 80% dos homens que morrem com cancro da próstata apresentam metástases ósseas (Ibrahim et al., 2010).

Existem vários mecanismos moleculares envolvidos na metastização do tecido ósseo por células tumorais, mas os principais são a perda de moléculas de adesão o que promove a transição de células epiteliais para mesenquimais (EMT), um processo que favorece a migração e invasão das células epiteliais cancerígenas. Um aumento da



expressão de metaloproteinases da matriz (MMPs) (como MMP2 e 9) e da uPA, que degradam a ECM, promovem a invasão e metastização das células tumorais. O microambiente do osso, bem como a interação das células tumorais com este microambiente parece também favorecer a metastização, dado que as células tumorais estimulam a libertação de fatores que promovem a sua progressão e invasão (Jin et al., 2011).

As principais terapias para este tipo de cancro têm como objetivo combater os mecanismos de resistência à castração, bem como inibir a interação das células tumorais com o microambiente do osso e baseiam-se em quimioterapia, imunoterapia, ou uma terapia combinada com estas duas, onde a quimioterapia é direcionada para os principais alvos responsáveis pelo desenvolvimento do mCRPC (inibidores do AR, inibidores das vias de sobrevivência alternativas ao AR (PI3K–Akt) e respetivos fatores de crescimento, inibidores da angiogénese, e inibidores contra fatores do microambiente ósseo que favoreçam a progressão do tumor, entre muitos outros) e a imunoterapia é aplicada para estimular uma resposta imune contra o tumor (Gerritsen and Sharma, 2012, Sluka and Davis, 2013)

A metastização óssea é o local mais comum de progressão do cancro da próstata, contrariamente aos linfonódulos, onde a maioria dos tumores da próstata invade mas não se desenvolve (Corn, 2012). Isto porque, a matriz óssea está em constante regeneração, e torna-se um local ideal para o desenvolvimento tumoral (Loriot et al., 2012). Contrariamente à maioria dos tumores sólidos que desenvolvem metástases de carácter osteolítico, as metástases ósseas no cancro da próstata são tipicamente osteoblásticas (Corn, 2012).

Uma complexa interação entre células tumorais, células da matriz óssea e células ósseas constitui o ciclo vicioso da formação das metástases ósseas mediado pelos osteoblastos. O tumor da próstata produz fatores osteogénicos tais como o PDGF, ET1 que cativam os osteoblastos, que vão depositar uma nova matriz para formar osso. Esta nova matriz, por um lado é um local ideal para o crescimento tumoral, dado que é rico em fatores de crescimento, por outro liberta um conjunto de fatores que atraem as células tumorais permitindo a sua sobrevivência e proliferação, e em contrapartida uma maior ativação dos osteoblastos (Ibrahim et al., 2010). Além disso, este aumento da ativação dos osteoblastos juntamente com outras citocinas produzidas pelas células tumorais vai provocar uma alteração nas citocinas envolvidas na regulação óssea (como o recetor ativador do fator nuclear K-B (NF-  $\kappa$ B) - (RANK) e seu ligando RANKL e a

osteoprotegerina (OPG), e aumentar a atividade dos osteoclastos que vão desencadear degradação da matriz, libertação de fatores de crescimento que vão aumentar a proliferação das células tumorais e dos osteoblastos, para uma maior formação de lesões osteoblásticas (Loriot et al., 2012, Francois Lamoureux, 2013, Saad, 2013, Foroudi, 2013).

As metástases ósseas provocam enfraquecimento ósseo que pode desencadear fraturas, e culminar na compressão da medula espinal. A própria formação do tumor, também pode desencadear essa compressão espinal (Foroudi, 2013, Saad, 2013).

## **2. Obesidade**

A obesidade tem atingido proporções epidémicas em todo o mundo. De acordo com as estimativas da Organização Mundial de Saúde (OMS) existe mais de um bilião de adultos com excesso de peso, dos quais pelo menos 300 milhões são obesos (Kanasaki and Koya, 2011). A mesma organização prevê que em 2015, cerca de 2.3 biliões de adultos terão excesso de peso e mais que 700 milhões serão obesos (Forte et al., 2012, Prieto-Hontoria et al., 2011) .

Segundo a definição da OMS a obesidade é uma acumulação anormal ou excessiva de gordura no tecido adiposo, que condiciona um risco para a saúde (Donohoe et al., 2011, Prieto-Hontoria et al., 2011, Ribeiro et al., 2012a) .

A causa fundamental para o excesso de peso e obesidade é um balanço positivo de energia, provocado por um desequilíbrio energético crónico, devido a uma disfuncionalidade do tecido adiposo, que leva a que o consumo ultrapasse o gasto de energia (Cheung and Mao, 2012).

Esta doença resulta de uma complexa interação entre o ambiente, a predisposição genética e o comportamento humano (Cheung and Mao, 2012, Prieto-Hontoria et al., 2011), mais concretamente por um aumento do consumo de calorias, juntamente com um estilo de vida sedentário (Ribeiro et al., 2010). O índice de massa corporal ( $IMC = kg/m^2$ ) é a medida mais comum para determinar a adiposidade corporal, contudo é uma medida com algumas limitações, pois de acordo com estudos recentes, 50% dos indivíduos com massa gorda suficiente para serem classificados como obesos, foram incorretamente classificados como não obesos quando avaliados pelo IMC isoladamente (Fowke et al., 2012) .

A obesidade, em particular a obesidade visceral, é considerada um enorme fator de risco para doenças metabólicas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e cancro (Nieman et al., 2013). Portanto, a obesidade está associada a várias co-morbidades como a diabetes tipo 2, hipertensão, doenças cardiovasculares (p.e acidente vascular cerebral, insuficiência cardíaca congestiva), problemas respiratórios (p.e. embolia pulmonar e síndrome obstrutivo de apneia do sono), problemas crónicos do aparelho músculo-esquelético, problemas de pele e infertilidade (Kanasaki and Koya, 2011, Paz-Filho et al., 2011, Kaidar-Person et al., 2011). A combinação de diabetes tipo 2/ hiperglicemia, resistência a insulina, hipertensão, obesidade central e dislipidemia é denominado por síndrome metabólico (Nieman et al., 2013). Outra das co-morbidades que está relacionada com a obesidade é o aumento do risco de cancro, tais como o adenocarcinoma do esófago, o cancro da mama, da próstata, colorretal, entre outros (Paz-Filho et al., 2011, Mistry et al., 2007, Forte et al., 2012).

A obesidade está associada a inflamação sistémica de baixo grau, o que parece desempenhar um importante papel na patogénese de doenças como a síndrome metabólico, a aterosclerose e o cancro (Forte et al., 2012, Prieto-Hontoria et al., 2011, Galic et al., 2010).

## **I. O tecido adiposo**

O tecido adiposo é um órgão metabolicamente ativo que desempenha um papel ativo na homeostasia energética, na imunidade, no equilíbrio endócrino e remodelação óssea (Paz-Filho et al., 2011). Este é um reservatório de energia complexo, cujas funções são reguladas por nervos, hormonas e nutrientes, assim como por mecanismos autócrinos e parácrinos (Ribeiro et al., 2012a). O tecido adiposo responde de forma rápida e dinâmica às alterações da disponibilidade de nutrientes, através da hipertrofia e hiperplasia dos adipócitos, mantendo assim a homeostasia energética (Sun et al., 2011).

O tecido adiposo é um órgão heterogéneo composto por vários tipos de células: a fração de adipócitos, que contém os adipócitos carregados de lípidos, e a fração estromal-vascular, que inclui pré-adipócitos, células endoteliais, fibroblastos, células estaminais, macrófagos e outras células do sistema imunológico (Ribeiro et al., 2012b). Os macrófagos são uma parte importante da função secretora do tecido adiposo e são a principal fonte de citocinas inflamatórias, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e a interleucina 6 (IL-6) (Galic et al., 2010).

Este tecido é ainda reconhecido como um órgão endócrino, sendo responsável pela síntese e secreção de vários fatores de crescimento, hormonas e citocinas, conhecidas como adipocinas ou adipocitocinas, que são produzidas exclusivamente, ou quase, pelos pré-adipócitos do tecido adiposo branco e adipócitos maduros (Paz-Filho et al., 2011). Curiosamente, adipócitos provenientes de diferentes locais de tecido adiposo (visceral/subcutâneo) tem funções metabólicas, potenciais de desenvolvimento, produção de citocinas e resposta a estímulos externos diferentes (Nieman et al., 2013).

Existem três tipos de tecido adiposo, o tecido adiposo branco, o tecido adiposo castanho e o tecido adiposo bege (Nieman et al., 2013).

O tecido adiposo branco é o mais abundante, encontra-se preferencialmente na região subcutânea e visceral e é responsável pelo armazenamento de energia, mais concretamente de lípidos (Nieman et al., 2013). O tecido adiposo castanho, presente em menor quantidade nos adultos, é responsável pela termogénese e caracteriza-se por ter uma expressão elevada da proteína desacopeladora 1 (UCP-1) (Tilg and Moschen, 2006, Nieman et al., 2013). O tecido adiposo branco secreta várias adipocinas, como por exemplo, a leptina, a adiponectina, ao contrário do tecido adiposo castanho, em que a produção das mesmas adipocinas é efetuada, somente pelas células termogénicamente inativas (Ortega et al., 2011). O tecido adiposo bege foi identificado muito recentemente, e apresenta características dos adipócitos brancos e castanhos. Os adipócitos brancos e castanhos provêm de células estaminais mesenquimais semelhantes que são ativadas por fatores de transcrição específicos dos adipócitos brancos e castanhos para se diferenciar nos seus respetivos subtipos. Ao contrário dos subtipos anteriores, os adipócitos beges diferenciam-se a partir da linhagem dos adipócitos brancos (Nieman et al., 2013). O processo de diferenciação dos pré-adipócitos em adipócitos é denominado por adipogénese, e constitui um passo crítico na fisiologia dos adipócitos, uma vez que permite o aumento do armazenamento de ácidos gordos, em forma de triglicérideos. Este processo de diferenciação é mediado por um importante fator de transcrição nuclear, recetor ativado pela proliferação do peroxisoma (PPAR- $\gamma$ ), que regulam um conjunto de fatores que participam na interação entre os adipócitos e as células tumorais, sendo portanto, um fator importante para avaliar a influência da obesidade e o cancro (Nieman et al., 2013).

Devido a função endócrina deste tecido adiposo, quando os adipócitos se tornam disfuncionais, como por exemplo na obesidade, são responsáveis pelo aparecimento de diversas patologias (Nieman et al., 2013).

Na obesidade, os adipócitos expandem-se devido à acumulação em excesso de triglicerídeos provocada pelo excesso de ácidos gordos produzidos por adipócitos disfuncionais, e ocorre a libertação não só ácidos gordos, como também de algumas adipocinas que são citocinas inflamatórias, tais como o TNF- $\alpha$ , a IL-6, assim como o inibidor do ativador do plasminogénio 1 (PAI-1), a proteína de ligação ao retinol, a visfatina e outras hormonas derivadas do tecido adiposo como a adiponectina, obestatina e a leptina (Forte et al., 2012).

## **II. Obesidade e o cancro da próstata**

Apesar da associação entre o cancro e a obesidade ser ainda controversa, sabe-se que esta está associada a um maior risco de desenvolver cancro (Ribeiro et al., 2012a).

Vários estudos epidemiológicos demonstram associações positivas entre a prevalência de obesidade e a incidência e mortalidade por cancro (Park et al., 2011). Além disso, a obesidade pode não só afetar o risco de desenvolver cancro, mas também interferir na sobrevivência do cancro. A nível mundial, a obesidade está associada com um aumento de 52% e 88% na taxa de mortalidade por cancro nos homens e mulheres, respectivamente. Aproximadamente, 14% de todas as mortes por cancro nos homens e 20% de todas as mortes por cancro em mulheres, são atribuídas ao excesso de peso e obesidade, contudo o mecanismo subjacente a esta relação, é ainda pouco compreendido (Kaidar-Person et al., 2011).

Diversos mecanismos têm sido propostos para explicar a interação entre a obesidade e o cancro e como a obesidade pode contribuir para o crescimento e desenvolvimento do cancro da próstata. Os principais baseiam-se na função endócrina e metabólica do tecido adiposo, e estão relacionados com alterações hormonais, mais concretamente o aumento dos estrogénios, da insulina e do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) (Fowke et al., 2012, Paz-Filho et al., 2011, Forte et al., 2012) assim como alterações na resposta imune e na expressão de adipocinas (Donohoe et al., 2011, Park et al., 2011).

Os fatores produzidos pelos adipócitos têm um papel importante na patogénese/carcinogénese de muitos cancros (Ribeiro et al., 2012b). A presença destes fatores no local do tumor resulta num aumento da sobrevivência, proliferação, invasão e metástase das células tumorais (Azevedo et al., 2011).

Na verdade, muitas adipocinas como a IGF-1, osteopontina, VEGF, trombospondina e citocinas inflamatórias (IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-8) têm os seus níveis aumentados na obesidade associada ao cancro, e possuem um efeito modulatório nos diferentes passos da motilidade celular (Ribeiro et al., 2012b, Azevedo et al., 2011). Estas adipocinas apresentam ainda um efeito mitogénico e proliferativo no crescimento celular das células do cancro da próstata, favorecendo assim o desenvolvimento e progressão celular do tumor. Contudo, este efeito parece ser mais significativo nas células tumorais independentes dos androgénios (Ribeiro et al., 2012b). Esta alteração no comportamento biológico dos tumores, e consequente progressão provocados pelas adipocinas parecem ser despoletados por uma interação entre os adipócitos e as células cancerígenas (Kaneko et al., 2010). Além disso, está descrito que estas adipocinas promovem um estado pró-inflamatório desencadeando danos no DNA e angiogénese, o que também vai favorecer a carcinogénese e posterior metastização, e por outro lado promovem a resistência a insulina, que provoca hiperinsulinemia, e aumento da insulina e do IGF-1, podendo estimular assim, a proliferação celular do tumor (Paz-Filho et al., 2011).

O peso e IMC elevados aumentam o risco de cancro da próstata agressivo e de mortalidade por este cancro (Bassett et al., 2012, Cao and Ma, 2011). Os homens obesos são mais propensos a desenvolver metástases ou morrer por cancro da próstata e tem maior risco de progressão da doença após prostatectomia radical, o que reforça a possibilidade da obesidade estar associada com uma biologia mais agressiva do tumor (Ribeiro et al., 2012b).

Outro mecanismo que parece estar relacionado com a obesidade e o cancro prende-se com a situação de hipoxia que ocorre a nível do tecido adiposo, quando há uma expansão exacerbada dos adipócitos disfuncionais. Esta hipoxia vai promover a libertação de fatores como o VEGF e metaloproteinases da matriz (MMPs), que poderão ser moduladores da angiogénese a nível tumoral, e assim estimular a progressão do tumor (van Kruijsdijk et al., 2009).

O microambiente tumoral constitui outro fator de extrema importância na progressão tumoral. As células tumorais interagem com as células circundantes do seu microambiente, para promover um ambiente favorável para a sua progressão. As células tumorais invadem os adipócitos circundantes e atuam sobre eles induzindo alterações no seu fenótipo, como perda do conteúdo lipídico, alterações na expressão de adipocinas, e perda de marcadores de adipócitos (como o APN, resistina, aP2) o que por sua vez vai

estimular um comportamento mais agressivo por parte das células tumorais (Dirat et al., 2011). As células do cancro da próstata exercem estes efeitos ao induzirem o aumento da atividade metabólica do tecido adiposo periprostático (tecido adiposo que circunda a próstata), promovendo um ambiente favorável para o desenvolvimento do tumor mais agressivo, isto é, mais invasivo e metastático (Ribeiro et al., 2012c). Atuam ao nível da regulação da expressão de adipocinas com potencial oncológico (como a Osteopontina, TNF- $\alpha$ , IL-6 e adiponectina), assim como da atividade das metaloproteinases da matriz (MMPs), que são essenciais para a progressão tumoral (Ribeiro et al., 2012b).

Assim sendo, doentes com cancro da próstata que apresentam elevada densidade de tecido adiposo periprostático evidenciam um tumor prostático mais agressivo (Sacca et al., 2012), devido a este tecido ser frequentemente invadido por células tumorais, o que constitui um fator patológico associado a um pior prognóstico (Rojas et al., 2011, Ribeiro et al., 2012c).

Além disso, sabe-se que comparativamente com a gordura localizada na região subcutânea, a gordura visceral é a que se associa a maior risco para o cancro da próstata (Bassett et al., 2012). E o perfil de expressão de adipocinas pelo tecido adiposo parece ser característico da região anatómica onde se localiza o depósito de gordura (Ribeiro et al., 2012b). Assim sendo, a progressão tumoral depende do próprio tumor assim como do microambiente que o circunda (Ribeiro et al., 2012c).

De acordo com estudos realizados, a obesidade no cancro da próstata tem um duplo efeito, pois está associada com uma diminuição do risco de ter cancro da próstata localizado, mas com um aumento do risco de ter cancro da próstata avançado (Discacciati et al., 2012).

A obesidade não parece estar diretamente relacionado com o desenvolvimento do carcinoma da próstata, mas sim com a sua maior agressividade, estando associada a tumores de elevado grau e a um maior risco de recorrência após tratamento com prostatectomia radical (Ankur M. Manvar, 2013, Katz, 2013a, Asmar et al., 2013). Do mesmo modo, a associação entre o cancro da próstata e a síndrome metabólica evidenciou que doentes com síndrome metabólica têm maior probabilidade de ter cancro da próstata avançado e de elevado grau, com maior risco de recorrência após terapia cirúrgica e por conseguinte maior probabilidade de morte associada ao cancro da próstata (Xiang et al., 2013).

Em suma, a obesidade parece não provocar o cancro, mas ser um seu promotor (Nieman et al., 2013).

### **III. As adipocinas**

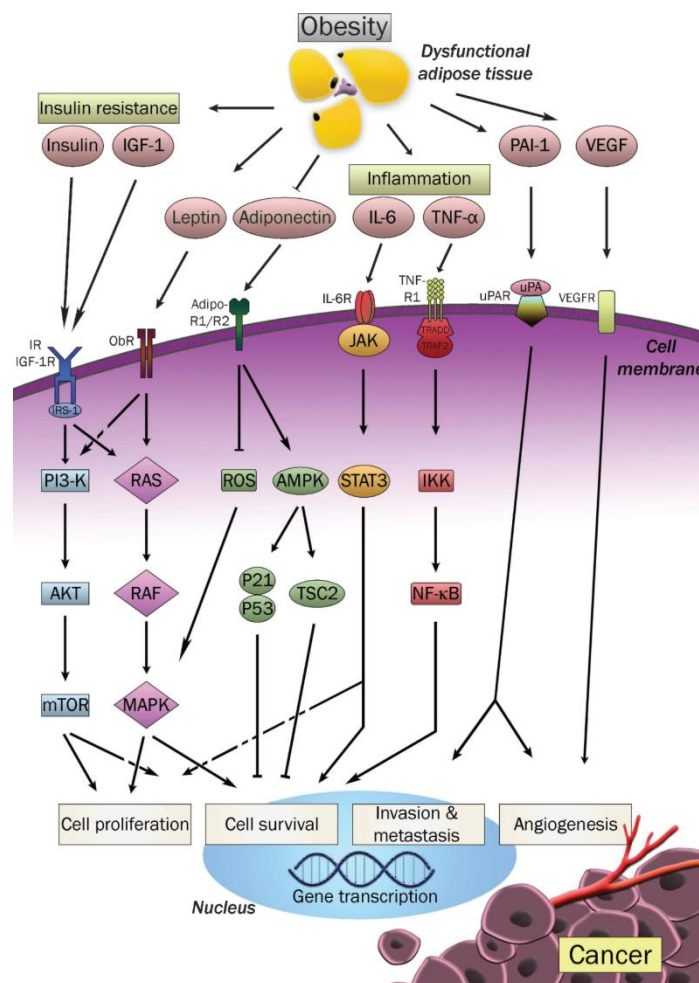
As adipocinas são hormonas produzidas no tecido adiposo. A leptina é a adipocina mais estudada e parece estar envolvida na manutenção e crescimento fisiológico da próstata (Leze et al., 2012), e tem sido umas das adipocinas mais relacionadas com o cancro da próstata e a obesidade, devido aos seus efeitos cruciais na proliferação celular, apoptose, invasão celular, angiogénese e na regulação da formação do tumor (Paz-Filho et al., 2011). De acordo com alguns estudos, os níveis elevados desta adipocina, observados na obesidade, estão associados a uma maior progressão do carcinoma da próstata, em particular de tumores androgénio independentes (Hoda et al., 2012, Prieto-Hontoria et al., 2011, Li et al., 2010). Contudo, outros estudos efetuados na linha celular RM1 do carcinoma da próstata androgénio independente evidenciaram que os elevados níveis de leptina estavam associados a uma proliferação celular menor (Ribeiro et al., 2012a). O que poderá dever-se ao facto das células independentes dos androgénios serem menos diferenciadas e mais autónomas que as dependentes, e por isso poderem depender menos do efeito do microambiente tumoral, mais concretamente das adipocinas (Nieman et al., 2013).

Ao contrário da leptina, a adiponectina possui efeitos anti-proliferativos e anti-cancerígenos, apresentando uma menor expressão na obesidade associada ao cancro (Prieto-Hontoria et al., 2011).

Existem outras adipocinas associadas ao cancro da próstata que se encontram também aumentadas na obesidade, tais como a IL-6 e o TNF- $\alpha$ , o PAI-1, entre muitas outras (Ribeiro et al., 2012b, Ribeiro et al., 2012a, Prieto-Hontoria et al., 2011, Rojas et al., 2011).

Muitas destas adipocinas interferem com diversas vias de sinalização, em especial com as que estão relacionadas com a progressão e desenvolvimento do cancro da próstata, tais como a via da JAK-STAT e das MAPK, fornecendo os sinais críticos de crescimento para progressão da doença (Leze et al., 2012, Hoda et al., 2012, van Kruijsdijk et al., 2009) (Figura 3).





**Figura 3-** Potenciais vias de sinalização estimuladas pelas adipocinas que relacionam a obesidade e o cancro.

AdipoR1/R2, recetor da adiponectina 1/2; AMPK, proteína cinase ativada pela adenosina monofosfato; IGF-1, fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IGF-1R, recetor do fator de crescimento semelhante a insulina do tipo 1; IKK, cinases IκB; IL-6, interleucina-6; IL-6R, recetor da interleucina-6; IR, recetor de insulina; IRS-1, recetor insulina substrato 1; JAK, cinase Janus; MAPK, proteína cinase ativada por mitogénese; mTOR, alvo da rapamicina do mamífero; NF-κB, fator nuclear-κB; ObR, recetor da leptina; PAI-1, inibidor do ativador do plasminogénio 1; PI3-K, cinase fosfatidilinositol 3; ROS, espécies reativas de oxigénio; STAT3, sinal transdutor e ativador de transcrição 3; TNF-α, fator de necrose tumoral - α; TNF-R1, recetor do fator de necrose tumoral; TRADD, domínios de morte associados TNFRSF1A; TRAF2, fator 2 associado ao recetor do TNF; TSC2, complexo 2 de esclerose tuberosa; uPA, urocinase ativadora do plasminogénio, uPAR, recetor da urocinase ativadora do plasminogénio; VEGF, fator de crescimento vascular endotelial; VEGFR, recetor fator de crescimento vascular endotelial (van Kruijsdijk et al., 2009)

A identificação de outros mecanismos moleculares que promovem a proliferação e sobrevivência das células de tumor da próstata é de extrema necessidade para o desenvolvimento de novas terapias para o cancro da próstata (Dagvadorj et al., 2007).

### **3. Objetivo**

Apesar da associação da obesidade com o cancro da próstata ser controversa, sabe-se que esta parece funcionar como um promotor do cancro e estar associada a um pior prognóstico, por isso é de extrema importância identificar a relação entre a obesidade e o cancro da próstata e os mecanismos por detrás desta relação.

Constitui objetivo deste trabalho avaliar os efeitos dos adipócitos na proliferação celular, migração e invasão da linha celular murina RM1 androgénio independente de cancro da próstata, quando co-cultivadas ou estimuladas com meio condicionado de culturas de pré-adipócitos e de adipócitos maduros provenientes da diferenciação de pré-adipócitos da linha celular murina 3T3-L1.

Assim estabeleceram-se os seguintes objetivos específicos:

- Avaliar o efeito da insulina e leptina na proliferação das RM1;
- Avaliar a proliferação celular das células RM1 em meio condicionado de cultura de adipócitos maduros e pré-adipócitos
- Avaliar a proliferação celular das células RM1 em co-cultura com pré- e adipócitos;
- Avaliar a capacidade de invasão e migração das células tumorais;
- Averiguar se as células tumorais, RM1, influenciam o fenótipo dos adipócitos.

## **Capitulo II: Materiais e Métodos**

As células de carcinoma da próstata androgénio independentes RM1, de origem murina, usadas neste estudo foram obtidas a partir de tumores induzidos em ratinhos Zip ras/myc-9 modelo MPR (cancro da próstata reconstituído em ratinho) produzidos no MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, USA, e gentilmente cedidas pela equipa do Prof T Thompson para realização do presente estudo (Baley et al., 1995).

As células 3T3-L1 são uma linha celular murina de pré-adipócitos isolados a partir da linha de células 3T3, obtida de embriões de ratinhos *swiss* (Green and Meuth, 1974, Todaro and Green, 1963), adquirida comercialmente (Zen-bio).

## **1. Cultura *in vitro* de células RM1 e 3T3-L1**

### **I. Preparação dos meios de cultura das linhas celulares**

As células RM1 foram cultivadas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Essential Medium, Sigma) com glucose elevada, suplementado com 10% de FBS (soro de bovino fetal, Gibco), 1% penicilina (100U/mL, Sigma) e 1% estreptomicina (100U/mL Sigma). O meio de congelamento das células RM1 era composto por DMEM com glucose elevada, 40% de FBS e 10% DMSO (dimetilsulfóxido, Sigma).

Para o cultivo das células 3T3-L1 fez-se uma solução de meio de cultura dos preadipócitos composta por DMEM com glucose elevada (Sigma) suplementado com 10% NCS (Soro de vitelo recém-nascido, Sigma) e 1% de penicilina-estreptomicina (100 U/mL, Sigma). A criopreservação das células foi feita em meio de congelação das 3T3 composto por DMEM com glucose elevada, 20% de FBS e 10% DMSO.

Para a diferenciação das células 3T3-L1 preparou-se um meio de cultura de diferenciação composto por DMEM-HAM-F12 (Dulbecco's Modified Essential Medium-Ham's Nutrient Mixtures, LOZDA), 10 % FBS e 1% Penicilina-estreptomicina (100 U/mL, Sigma) suplementado com um cocktail hormonal composto por 500 µM de 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX, Sigma), 250 nM de dexametasona (Sigma) e 10ug/mL de insulina humana (Actrapid, Novonordisk). De modo a ficarem com a concentração desejada, os compostos IBMX e dexametasona foram dissolvidos nos seus respetivos reagentes, DMSO (Sigma) e etanol absoluto (Aga). Ambos os compostos foram aliquotados e armazenados a -20°C. Foi preparado um segundo meio de cultura de diferenciação constituído pelos mesmos compostos, com exceção do IBMX e da dexametasona.

Os adipócitos maduros foram mantidos com meio de cultura de adipócitos composto por DMEM-HAM-F12, 10% de FBS e 1% de Penicilina- estreptomicina (100 U/mL).

## **II. Cultura das RM1**

Após descongelamento rápido em banho a 37°C das células RM1 na P9 previamente criopreservadas a -80°C, até estar cerca de metade do conteúdo descongelado, as células foram transferidas para um tubo centrífuga (TPP) contendo 5mL do meio de cultura e centrifugadas a 900 rpm durante 3 min. Após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e o *pellet* de células foi ressuspensionado em meio de cultura completo e transferido para um frasco de cultura de 25cm<sup>3</sup>, que foi colocado numa incubadora (Heracell 150, Thermo Scientific) a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de cultura foi mudado 24h depois de semeadas as células, para eliminar células mortas e posteriormente de dois em dois dias, ou sempre que se justificasse, para renovar os nutrientes das células.

As culturas foram mantidas até a formação de monocamada (confluência de 85-90%), quando foi efetuada a tripsinização, para posterior subcultura ou congelamento das células. Neste processo, o meio de cultura das células foi todo retirado e procedeu-se a uma lavagem das células com PBS 1% (Gibco) para retirar excesso de proteínas do soro, que pudesse inativar a solução de tripsina/EDTA (Sigma), que se colocaria de seguida durante 2-3 minutos a 37°C para que ocorresse a desagregação da monocamada. De seguida, adicionou-se meio de cultura completo (o dobro da quantidade de solução de tripsina usada) para neutralizar a tripsina, transferiram-se as células para um tubo de centrífuga, e procedeu-se à centrifugação a 1100 rpm durante 5 min. Após centrifugação, descartou-se o sobrenadante e ressuspenderam-se as células em meio de cultura ou meio de congelação, no caso de sub-cultura ou criopreservação das células, respectivamente.

Após ressuspensão das células procedeu-se a contagem em câmara de Neubauer no microscópio óptico invertido (101M, Motic), para contagem do número de células existente e poderem ser alíquotadas.

As células das passagens 11, 12, 13 foram congeladas em criotubos (Greiner Bio-one), colocando em cada criotubo, aproximadamente, 2 milhões (2x10<sup>6</sup>) de células com meio de congelação, a serem congeladas de forma gradual, começando por ser colocadas a 4°C durante 30 minutos, passando para -20°C, outros 30 minutos, e por fim colocaram-se na arca -80°C para posterior utilização nos ensaios.

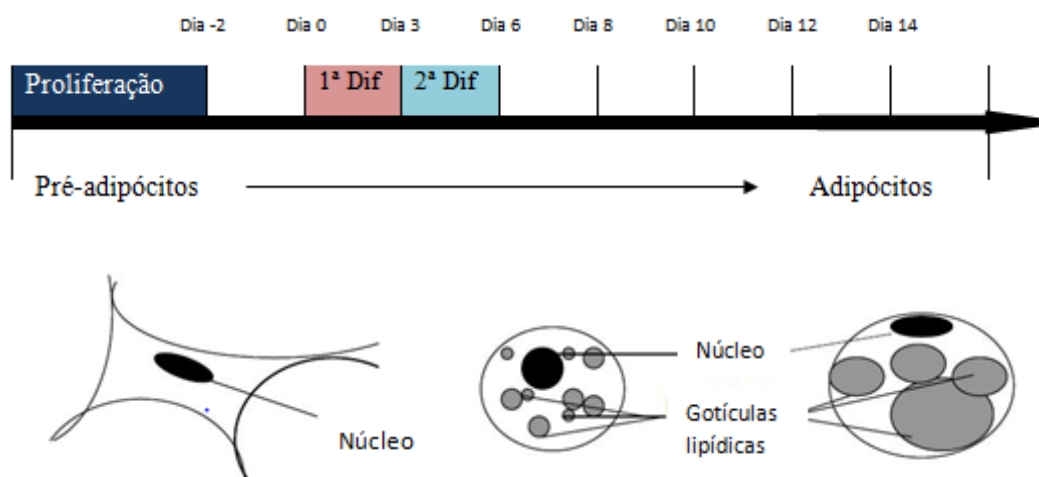
Quando as células foram sub-cultivadas, após a contagem foram novamente semeadas em frascos de cultura com uma diluição apropriada, e colocadas na incubadora.

### **III. Cultura das células 3T3-L1**

As células 3T3-L1 foram cultivadas seguindo procedimentos semelhantes aos efetuados para a cultura das células RM1, com algumas exceções. A descongelação e a manutenção das culturas foram efetuadas utilizando o método descrito para as células RM1 mas usando o meio de cultura das 3T3 (descrito previamente). No entanto, a tripsinização das células foi realizada quando a monocamada apresentava cerca de 70% de confluência. A tripsinização, a criopreservação e subcultura das células foi igualmente realizado do mesmo modo já descrito, tendo apenas variado o meio de congelação usado, que neste caso foi o meio de congelação das 3T3-L1.

### **IV. Diferenciação das células 3T3-L1 em adipócitos**

A diferenciação das células 3T3 em adipócitos foi induzida 2 dias após as células terem atingido a confluência total, com meio de diferenciação suplementado como descrito anteriormente, contendo 0.5mM 3-isobutil-1-metilxantina (IBMX), 0.25µM dexametasona (DEX) e 10µg/mL de insulina (INS). Após 3 dias, foi retirado este meio de diferenciação e colocou-se novo meio suplementado com 10µg/mL de insulina (INS) durante mais 3 dias (Figura 4). No final da diferenciação, os adipócitos foram cultivados com meio de cultura de adipócitos suplementado de acordo com o previamente mencionado.



**Figura 4-** Representação esquemática da diferenciação das células 3T3-L1.

Toda a manutenção das culturas celulares e os estudos realizados foram efetuados em câmara de fluxo laminar.

## **2. Determinação da curva de crescimento**

### **I. Determinação da curva de crescimento por contagem em Neubauer**

De modo a determinar qual a concentração celular ideal a utilizar nos diferentes estudos, foi efetuada uma curva crescimento de diferentes concentrações iniciais de células RM1 ( $2 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $7 \times 10^4$  cél/mL) em placas de 24 poços. A densidade celular foi avaliada em diferentes tempos (12, 24 e às 36h) por contagem celular recorrendo a câmara de Neubauer e ao corante Trypan Blue 0.4% (Sigma) no microscópio óptico invertido (101M, Motic), de acordo com o procedimento descrito anteriormente.

### **II. Determinação da curva de crescimento pelo método indireto- XTT**

A densidade celular foi também avaliada de modo indireto pelo XTT, através da percentagem de redução do sal de tetrazólio (XTT, Applichem) determinada pela leitura de absorvâncias em espetrofotómetro. Para isso, cultivaram-se diferentes concentrações de células RM1 ( $2 \times 10^4$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$  cél/mL), e foi monitorizado o crescimento pela adição do composto XTT, seguida de leitura das absorvâncias nos comprimentos de onda 450 nm e 620nm, nos diferentes tempos. A proliferação celular foi calculada tendo em conta a percentagem de redução do composto, usando a seguinte formula:

$$\% \text{ Redução} = \frac{A_{450} - A_{620}}{A_{450}}$$

## **3. Avaliação do efeito da insulina e da leptina na proliferação das RM1**

### **I. Avaliação do efeito da insulina na proliferação das células RM1 por contagem em Neubauer**

As células RM1 da passagem 12, 13, 14 ( $4 \times 10^4$  células /mL; concentração considerada ideal pela curva de crescimento) foram cultivadas em placas de 24 poços, em triplicado, na presença de diferentes concentrações de insulina humana (Actrapid,

Novonordisk) (0nmol/L, 200nmol/L e 800nmol/L). A proliferação celular foi avaliada às 12 e às 36h, recorrendo a contagem celular em câmara de Neubauer, no microscópio óptico invertido, de acordo com o procedimento já descrito.

## **II. Avaliação do efeito da insulina na proliferação das células RM1 pelo método do Alamar blue**

A proliferação celular da RM1 foi também avaliada com recurso ao método indireto do alamar blue, no tempo 12h, 24h e 36h. Para isso, cultivaram-se as células RM1 ( $4 \times 10^4$  células/poço) em placas de 24 poços com diferentes concentrações de insulina (0nmol/L, 200nmol/L, 800nmol/L e 1600nmol/L), na presença do composto alamar blue e a percentagem de redução da resazurina foi avaliada por leitura da absorvância nos comprimentos de onda 570 nm e a 595nm, como recomendado pelo produtor. A proliferação celular foi calculada tendo por base a % de redução do composto (resazurina), usando a seguinte formula:

$$\% \text{redução} = \frac{(E_{ox})_{\lambda 2} \times A_{\lambda 1} - (E_{ox})_{\lambda 1} \times A_{\lambda 2}}{(E_{red})_{\lambda 1} \times (A_{\text{branco}})_{\lambda 2} - (E_{red})_{\lambda 2} \times (A_{\text{branco}})_{\lambda 1}} \times 100,$$

sendo que o  $\lambda 2$  corresponde ao comprimento 595 nm, e o  $\lambda 1$  ao de 570 nm, e o  $E_{ox_{570nm}}=80,573$ ,  $E_{ox_{595nm}}=117,216$ ,  $E_{red_{570nm}}=155,667$  e  $E_{red_{600nm}}=14,652$ .

## **III. Avaliação do efeito da leptina na proliferação das células RM1 pelo método do Alamar blue**

A proliferação celular das RM1 cultivadas na presença da leptina (rec leptin (mouse) H-5582, Bachem) foi avaliada com recurso ao método indireto do alamar blue, nos tempos 12h, 24h e 36h. À semelhança do que foi efetuado para a insulina, também se cultivaram as células ( $4 \times 10^4$  células/poço) em placas de 24 poços com diferentes concentrações de leptina (0ng/mL, 10ng/mL, 50ng/mL e 100ng/mL), ao qual se adicionou o composto alamar blue para posterior leitura da absorvância, nos comprimentos de onda recomendados e determinação da proliferação celular.



#### **4. Avaliação da proliferação celular das RM1 em meio condicionado de pré-adipócitos e adipócitos.**

O grau de proliferação celular *in vitro* foi avaliado recorrendo a duas técnicas distintas, nomeadamente: avaliação indireta da proliferação através da avaliação da percentagem de redução metabólica do sal de tetrazólio –XTT (Applichem) e avaliação direta utilizando contagem celular em câmara de Neubauer.

##### **I. Avaliação direta por contagem em Neubaeur**

Para avaliar a proliferação celular das células RM1 cultivadas em meio condicionado, primeiramente efetuou-se a recolha de meio condicionado da cultura dos adipócitos e pré-adipócitos. Realizou-se a colheita do mesmo meio sem FBS após estar 24 e 48 horas em cultura com adipócitos e 24h com pré-adipócitos, sendo que após recolha o meio foi armazenado a -80°C até ser usado.

Após descongelamento das células RM1, de acordo com o procedimento descrito anteriormente, semearam-se  $4 \times 10^4$  células/ml em placas de 24 poços com meio condicionado de pré-adipócitos e adipócitos sem FBS, durante 24h. Como controlos negativos foram utilizados o meio DMEM de crescimento das RM1 e pré-adipócitos e o meio DMEM-F12 de manutenção dos adipócitos, ambos sem FBS. Todas as condições foram testadas em células na passagem 12, 13 e 14, e para cada condição efetuaram-se três réplicas. No final das 24h, os meios foram descartados, as células foram tripsinizadas e procedeu-se a contagem das células coradas com Trypan Blue em câmara de Neubauer no microscópio óptico invertido.

##### **II. Avaliação indireta pelo método do XTT**

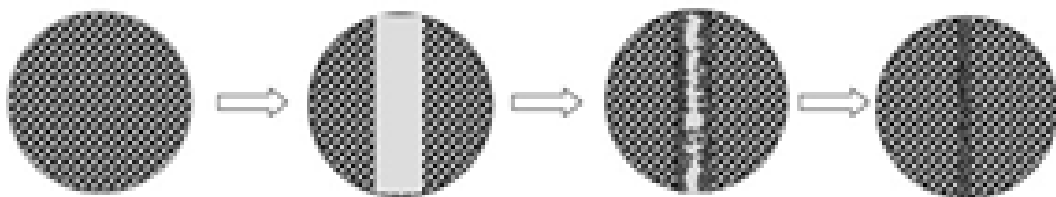
De forma a avaliar a proliferação das células cultivadas no meio condicionado, usou-se o método indireto do XTT, que se baseia na redução metabólica de um composto sal de tetrazólio (XTT) para um produto colorimétrico avaliado por espectrofotometria. A avaliação da proliferação é feita de acordo com percentagem de redução do composto, ou seja quanto maior for a percentagem de redução de composto maior será a proliferação das células.

Este teste foi realizado para avaliação da proliferação das células na presença dos mesmos meios condicionados referidos anteriormente. Para este estudo utilizaram-se as

mesmas passagens usadas para o método direto, e efetuaram-se cinco réplicas para cada condição. Depois de descongelar as células RM1 seguindo o procedimento já referido anteriormente, estas foram cultivadas em placas de 96 poços durante 12h com o seu meio de cultura. Após 12h, retirou-se o meio das células, colocaram-se os respetivos meios condicionados e os controlos negativos, durante 24h. Três horas antes do término das 24h retiraram-se as placas da incubadora, foram adicionados 40µL de reagente XTT por poço, e as células voltaram a ser colocadas na estufa. Às 24h, as células foram retiradas da estufa, colocadas no leitor de placas (Thermo Scientific), e lida a absorvância nos comprimentos de onda 620nm e 450nm no espectrofotómetro, sendo que o comprimento de onda 620 nm foi usado para minimizar o ruído de fundo.

### **5. Ensaio de migração por dano**

Para avaliar a atividade migratória, realizou-se um ensaio de migração por dano, *wound healing*, que consistiu em realizar um traço com uma ponta de uma micropipeta na monocamada de células RM1 nas diferentes passagens cultivadas em placa 12 poços (TPP), com o objetivo de desagregar mecanicamente uma parte das células, para posteriormente avaliar a capacidade de migração das mesmas para o local onde foi realizado o traço. Células RM1 da passagem 12, 13 e 14 foram cultivadas e mantidas até a cultura atingir 80% de confluência, altura em que foi realizado o traço, e se adicionaram os diferentes meios condicionados das culturas de pré-adipócitos e adipócitos, utilizando o meio de cultura normal das células como controlo negativo. De seguida, fotografou-se o traço na placa de todos os poços das diferentes condições, e colocou-se as células na incubadora durante 24h (Figura 5). No final da incubação, procedeu-se à avaliação da capacidade de migração das células pela análise do grau de preenchimento celular da zona onde foi realizado o traço, para isso fotografou-se a zona do traço novamente (tendo o cuidado de fotografar no mesmo local) e procedeu-se a análise da área de preenchimento, no programa Image J. Para cada condição testada efetuaram-se três réplicas e para cada réplica tiraram-se quatro fotografias.



**Figura 5-** Ilustração do ensaio de migração por dano. Adaptado de (Eccles et al., 2005).

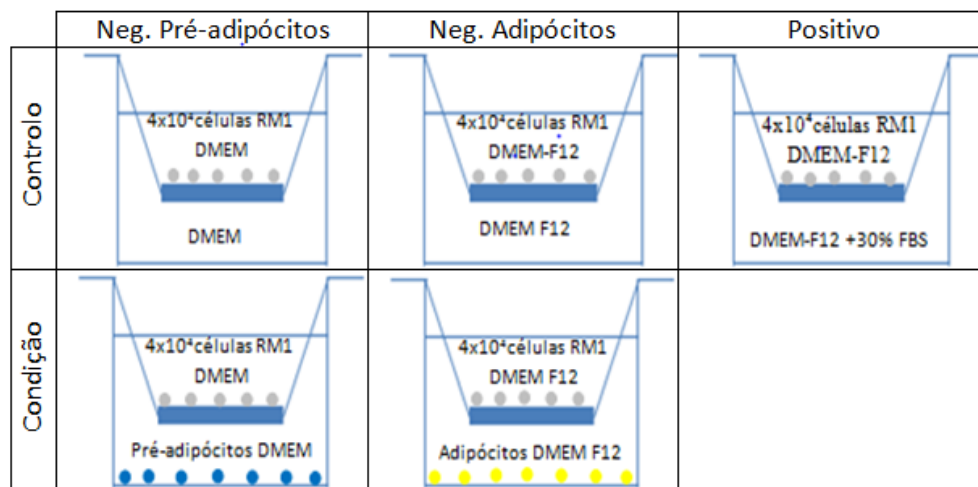
## 6. Avaliação da capacidade de invasão das células RM1

A capacidade de invasão das células RM1 foi avaliada recorrendo a um sistema de transwells para placa de 24 poços, recorrendo a membranas com matrigel com poros de 8  $\mu\text{m}$  (BD Biosciences) contidas nos *inserts*.

As células 3T3-L1 (pré-adipócitos e adipócitos) foram cultivadas nas placas de 24 poços onde *a posteriori* se colocaram os *inserts*.

Resumidamente, após serem retirados do congelador, os *inserts* foram transferidos para uma placa de 24 poços, contendo 750  $\mu\text{L}$  de meio DMEM e DMEM-F12 sem FBS, meios base de cultura de pré-adipócitos e adipócitos. Os meios de cultura usados neste ensaio foram todos sem FBS, à exceção do meio do controlo positivo que terá 30% de FBS.

Após transferência dos *inserts* para os poços, foram adicionados mais 500  $\mu\text{L}$  do mesmo meio contido nos poços, e colocados na incubadora durante 1 hora, durante a qual se procedeu à tripsinização das células RM1 e contagem em câmara de Neubauer. A montagem do ensaio consistiu em transferir os *inserts* de matrigel pré-incubados para as placas de 24 poços, que continham as culturas de pré-adipócitos e adipócitos, sendo adicionadas de seguida as células RM1 ( $4 \times 10^4$  células/ poço) em 500  $\mu\text{L}$  de meio DMEM e DMEM\_F12 sem FBS (consoante o tipo de meio contido na placa), e incubadas durante 24 horas a 37°C, e 5% de  $\text{CO}_2$  (Figura 6). Como controlo negativo foi usado o meio DMEM e de DMEM-F12 sem FBS, e como controlo positivo foi usado o meio DMEM-F12 contendo 30% de FBS.



**Figura 6-** Representação esquemática do ensaio de invasão, ilustrando as várias condições estudadas.

No final das 24 horas, o meio das culturas foi retirado e congelado, para utilização em ensaios posteriores. De seguida, os *inserts* foram lavados (2X) numa placa de petri com PBS a 1%, e as células na matrigel foram fixadas com paraformaldeído a 4%, durante 10 minutos. Após a fixação, efetuou-se a limpeza cuidadosa com zaragatoa da região que esteve em contato com as células RM1, procedeu-se à remoção com ajuda de uma lâmina de bisturi da membrana de matrigel do *inserts*, e efetuou-se a sua montagem numa lâmina com Vectashield e DAPI. A contagem das células que invadiram a membrana e migraram foi realizada no microscópio de fluorescência, para tal, os núcleos das células presentes em cada membrana foram contados em dez campos de grande aumento (200x). O número de células migradas foi estimado tendo em consideração a área de um campo do microscópio e a área total da membrana.

**7. Avaliação da proliferação das células RM1 e da sua interferência nos adipócitos em co-cultura.**

**I. Avaliação da proliferação das células em co-cultura em sistema de transwells**

A avaliação da proliferação das células foi efetuada em co-cultura, recorrendo ao sistema de transwell com membrana de PET (BD Biosciences), com poros de 0.4  $\mu$ l, que evita o contato direto das células, mas permite a passagem de sinais secretados para o meio.

Para o estudo foram utilizados pré-adipócitos e adipócitos, obtidos por diferenciação dos pré-adipócitos 3T3-L1, cultivados em placas de 24 poços. Os *inserts* foram colocados nos poços e de seguida as células RM1 ( $4 \times 10^4$ ) foram adicionadas e deixadas em co-cultura durante 24h. Posteriormente foram recolhidos os meios de cultura dos *inserts* e da placa e armazenados a -80 C. A proliferação celular das RM1 foi avaliada pela contagem do número de células com beads (esferas magnéticas) em citómetro de fluxo.

## **II. Avaliação da interferência das células RM1 nos adipócitos em co-cultura**

Para a realização da co-cultura das RM1 com adipócitos, primeiramente as células 3T3-L1 foram cultivadas e diferenciadas em adipócitos e posteriormente adicionaram-se as células RM1 ( $4 \times 10^4$  células/poço) às culturas de adipócitos durante 24 e 48 horas.

Como controlo negativo usaram-se adipócitos na mesma passagem que foram diferenciados na mesma altura que os adipócitos usados na co-cultura.

De seguida, foi avaliado visualmente o efeito das células RM1 nos adipócitos.

### **8. Análise estatística**

Para cada condição estudada foi realizado a média e o erro padrão da média e analisada a normalidade, quando possível, dos conjuntos de dados a analisar através do teste de Kolmogorov – Smirnov.

A diferença dois grupos experimentais independentes foi avaliada por um teste T Student não emparelhado. Quando as amostras não apresentavam uma distribuição normal o teste usado foi o Mann-Whitney U. Para comparar três ou mais grupos independentes com distribuição normal utilizou-se uma análise de variância simples (one way anova) com o teste post- hoc Newman keuls. Quando uma das amostras não apresentavam normalidade utilizou-se uma anova de Kruskal- Wallis com o post-hoc Dunns.

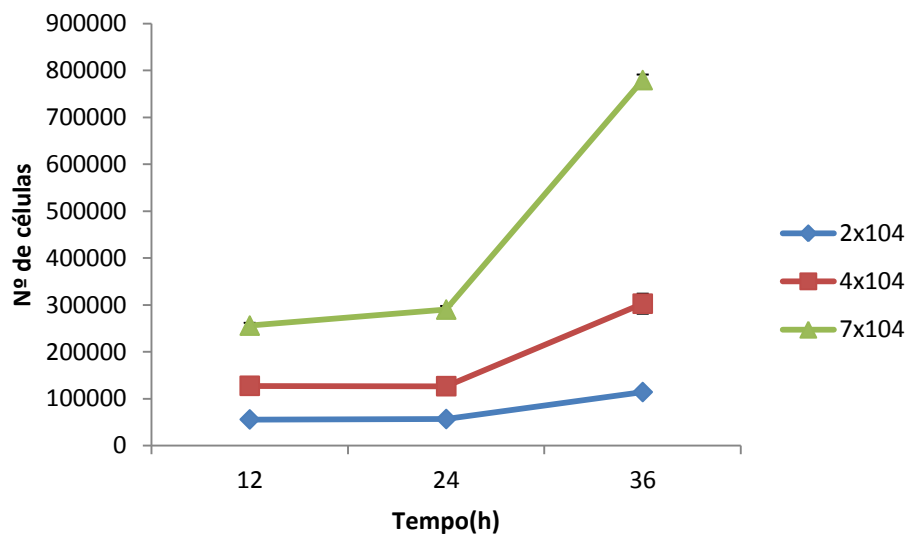
Um valor de  $p < 0.05$  foi considerado estatisticamente significativo. Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do excel e do software graphpad prism 5 (graphpad software, Inc., La Jola, CA) versão para Windows.

### **Capitulo III: Resultados**

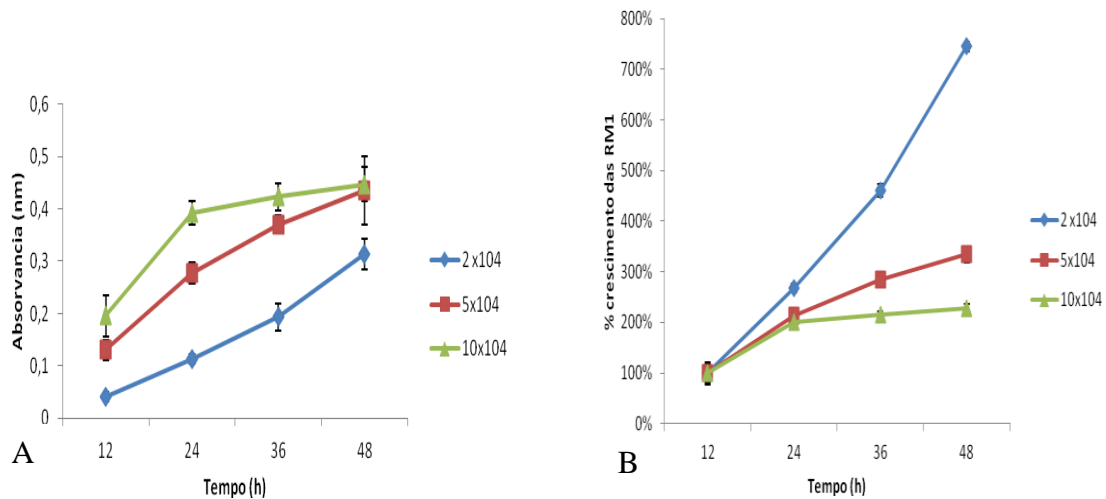
De modo a estudar os efeitos do tecido adiposo, nomeadamente dos pré-adipócitos e adipócitos nas células RM1 de carcinoma da próstata, foi avaliada a capacidade de proliferação, migração e invasão celular das células neoplásicas quando cultivadas com meios condicionados ou co-cultivadas com pré-adipócitos e adipócitos.

### **1. Curva de crescimento das células RM1**

A curva de crescimento de diferentes concentrações iniciais de células RM1, realizada para determinar a concentração celular mais adequada para os ensaios a realizar, foi efetuada recorrendo à contagem direta da proliferação em câmara de Neubauer (Figura 7) e ao método indireto para determinar a proliferação baseado na percentagem de redução do sal de tetrazólio (método do XTT) (Figura 8A e B).



**Figura 7-** Curva de crescimento das células RM1 obtida a partir de diferentes concentrações de células, por contagem celular em câmara de Neubauer.



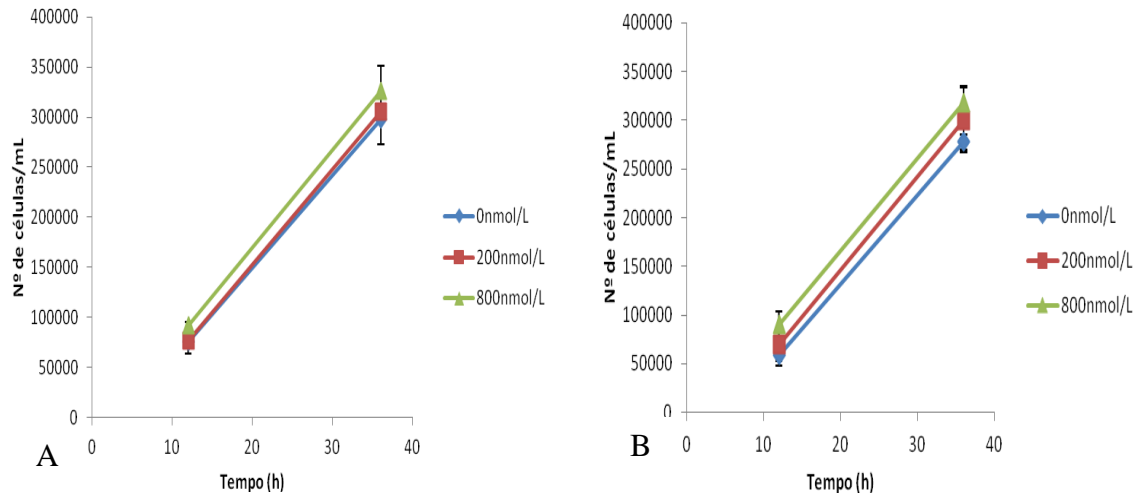
**Figura 8** – Curva de crescimento estabelecida pelo método indireto de XTT através da % de redução do sal de tetrazólio. A- Avaliação do crescimento em função das absorvâncias obtidas pela redução do composto. B- Avaliação do crescimento em forma de percentagem.

Após análise das duas curvas, foi escolhida a concentração de  $4 \times 10^4$  células/mL para os estudos subsequentes, em placas de 24 poços, por ser a que apresentou melhor crescimento linear às 36 horas, o intervalo temporal a utilizar na maioria dos estudos (Figura 8A e B); e para o método do XTT, a realizar em placas de 96 poços escolheu-se a concentração de  $5 \times 10^4$ , por ser a que apresentou melhor crescimento no mesmo tempo.

## **2. Avaliação do efeito da insulina no crescimento celular das RM1**

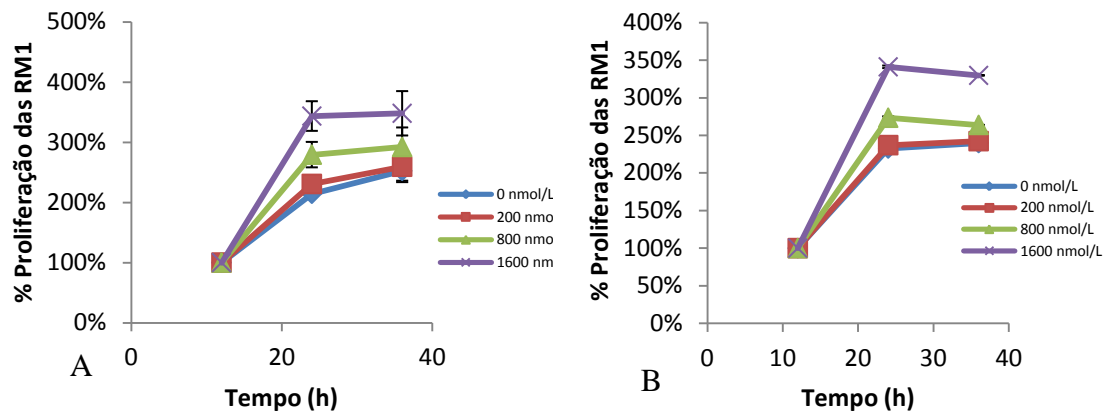
O grau de proliferação celular das RM1 cultivadas na presença de diferentes concentrações de insulina (0, 200, 800 nmol/L) foi avaliado, em diferentes tempos, por contagem direta do número de células em câmara de Neubauer, não tendo sido observadas diferenças significativas no crescimento das células RM1 nas diferentes passagens (Figura 9A) na presença das várias concentrações de insulina comparativamente com o controlo, assim como quando se avaliou cada uma das passagens individualmente (Figura 9B).





**Figura 9-** Proliferação celular das células RM1, com a concentração de  $4 \times 10^4$ /mL cultivadas na presença de diferentes concentrações de insulina, avaliada ao longo do tempo por contagem direta em camara de Neubauer. A- Efeito da insulina no crescimento das células das diferentes passagens estudadas (P12, P13 e P14) B- Efeito da insulina no crescimento das células da passagem 14.

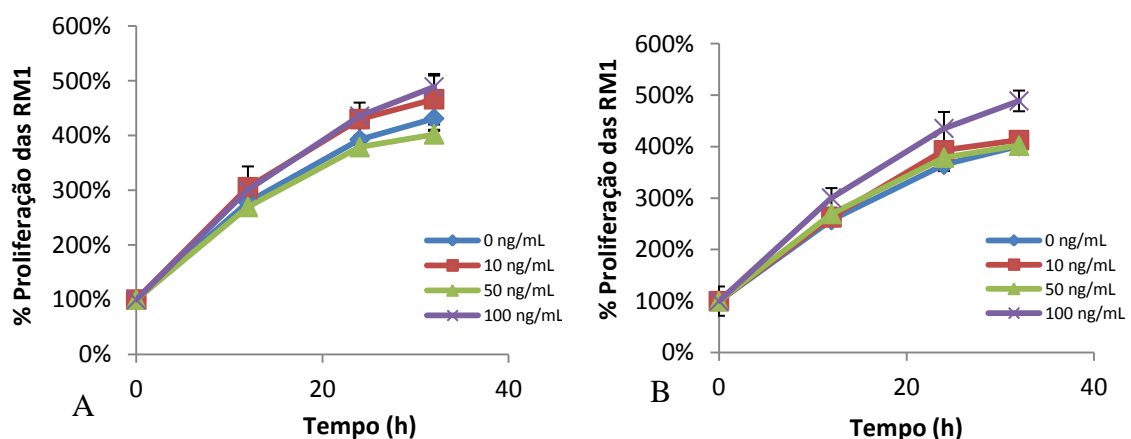
Quando se avaliou a proliferação celular na presença de insulina pelo método do Alamar Blue, já se observaram diferenças significativas no crescimento celular, em todas as passagens em conjunto, observando-se uma maior proliferação com concentração de 1600 nmol/L em relação as restantes concentrações usadas, às 24 horas ( $p < 0,01$ ). Às 36 horas, as diferenças já não foram significativas, possivelmente devido a maiores desvios observados, apesar de se manter a mesma tendência, a concentração mais alta a desencadear maior proliferação (Figura 10A). Analisando uma passagem individualmente, verificou-se diferenças significativas na proliferação das células cultivadas na presença de concentrações mais elevadas de insulina (1600 nmol/L) relativamente as concentrações mais baixas (0, 200, 800 nmol/L), tanto às 24h ( $p < 0,01$ ) como às 36 horas ( $p < 0,001$ ) (Figura 10B).



**Figura 10** – Efeito da insulina na proliferação celular, determinado pelo método indireto do alamar blue. A- Proliferação celular das RM1 nas diferentes concentrações de insulina estudadas, para as três passagens analisadas em conjunto. B- Proliferação celular das RM1 na passagem 14, para as diversas concentrações de insulina testadas.

### 3. Avaliação do efeito da leptina no crescimento celular das RM1

A proliferação das células RM1 na presença de diferentes concentrações de leptina foi avaliada em diferentes tempos recorrendo ao método indireto do alamar blue. Analisando os resultados verificou-se que não existem diferenças significativas na proliferação das células, nas diferentes concentrações usadas, tanto analisando as diferentes passagens (Figura 11A), como apenas uma das passagens (Figura 11B).



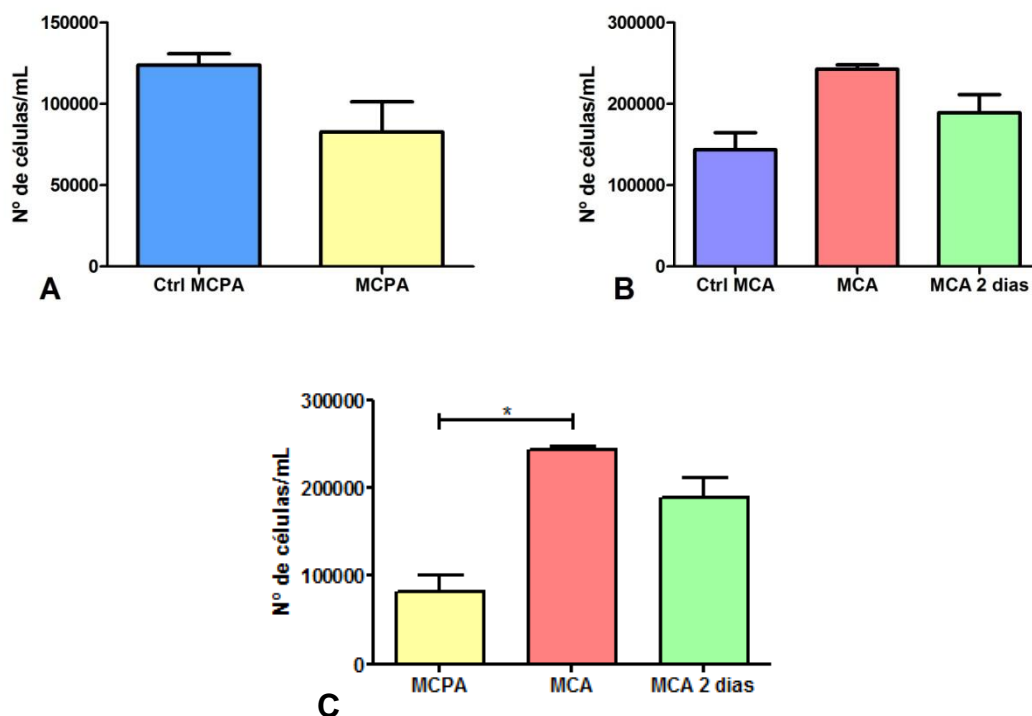
**Figura 11-** Efeito da leptina na proliferação celular, determinado pelo método indireto do alamar blue. A- Proliferação celular das RM1 nas diferentes concentrações de leptina estudadas, para as passagens analisadas em conjunto. B- Proliferação celular das RM1 na passagem 14 para as diversas concentrações de leptina.

#### 4. Avaliação da proliferação das células RM1 cultivadas com meio condicionado

A avaliação da proliferação das células RM1 nas diferentes passagens utilizadas foi realizada por dois métodos diferentes, contagem direta em camara de Neubauer e de forma indireta pelo método do XTT.

##### I. Avaliação da proliferação por contagem em camara de Neubaeur

O método de contagem direta do número de células cultivadas com meios condicionados demonstrou, de um modo geral, quando analisamos as três passagens em conjunto, que o meio condicionado dos adipócitos (MCA) parece influenciar o crescimento das células RM1, enquanto o meio condicionado dos pré-adipócitos (MCPA) parece não apresentar qualquer efeito quando comparado com o meio de cultura controlo (Figura 12 A e B).

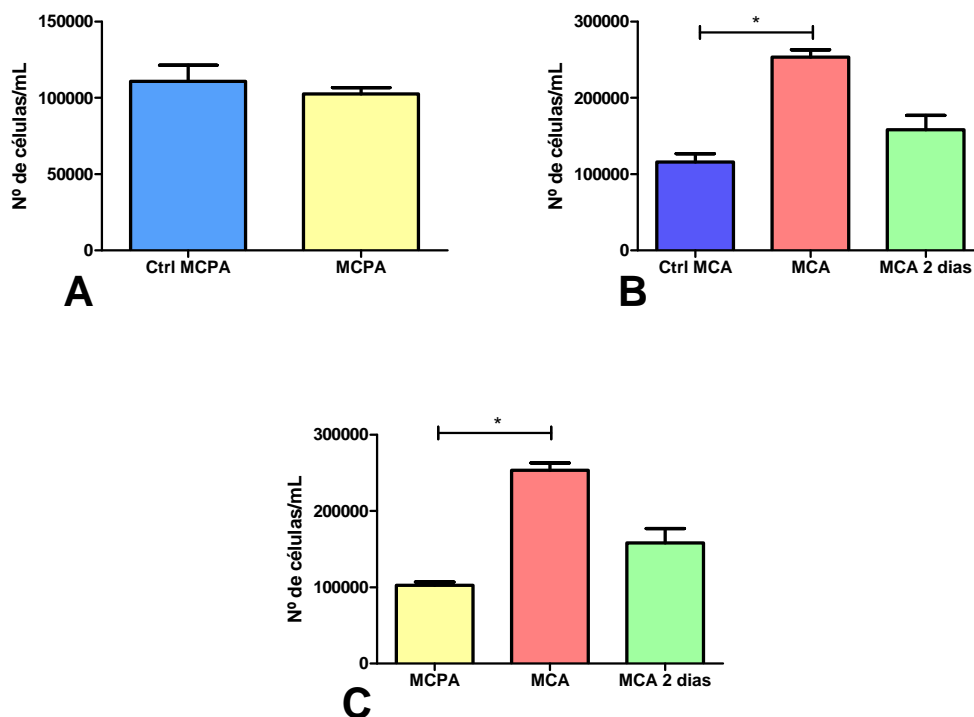


**Figura 12** - Proliferação das células RM1, nas passagens P12, P13 e P14, na presença de diferentes meios. A- Proliferação das células na presença de meio condicionado de pré-adipócitos comparativamente com o controlo. B- Proliferação celular na presença de meio condicionado dos adipócitos de 24 e 48 horas,

em relação ao controlo. C- Proliferação celular nos meios condicionados de adipócitos (1 e 2 dias) comparativamente com o meio dos pré-adipócitos (\* $p<0.05$ ).

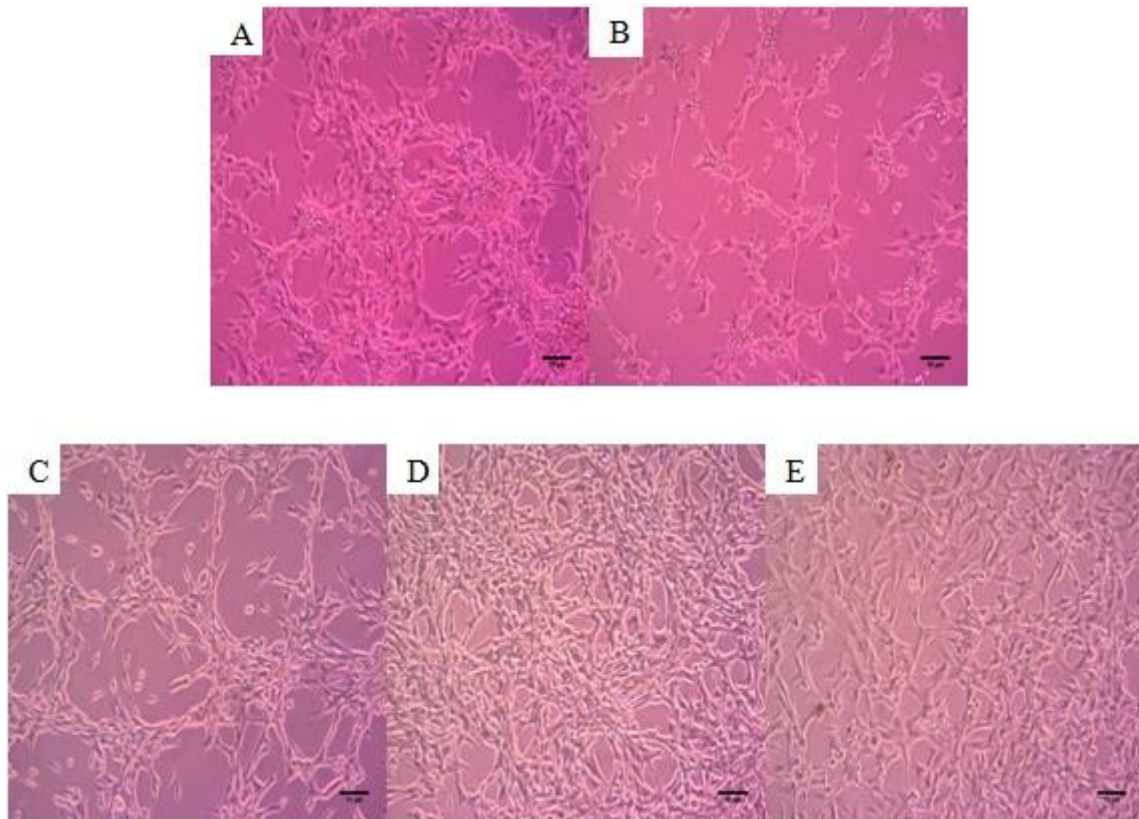
Contudo o efeito do meio condicionado dos adipócitos não foi estatisticamente significativo ( $p=0.0509$ ). Analisando o efeito do MCA de 1 e 2 dias com o MCPA verificou-se uma diferença significativa entre o MCA de 1 dia e o MCPA ( $p<0.05$ ) (Figura 12C).

Quando se procedeu à avaliação das passagens individualmente verificou-se uma diferença significativa ( $p<0.05$ ) no crescimento celular das RM1 com meio condicionado dos adipócitos comparativamente com o controlo, numa das passagens utilizadas (P14), (Figura 13B). O meio condicionado dos pré-adipócitos permaneceu sem efeito no crescimento celular (Figura 13A). E quando comparado o efeito dos três meios verifica-se uma diferença significativa na proliferação celular, novamente entre o MCA e o MCPA ( $p<0.05$ ) (Figura 13C).



**Figura 13-** Proliferação celular das RM1 da passagem 14, na presença de diferentes meios condicionados. A- Proliferação das células na presença de meio condicionado de pré-adipócitos comparativamente com o controlo. B- Proliferação celular na presença de meio condicionado dos adipócitos de 24 e 48 horas, em relação ao controlo. C- Proliferação celular para os três meios testados (\*  $p<0.05$ ).

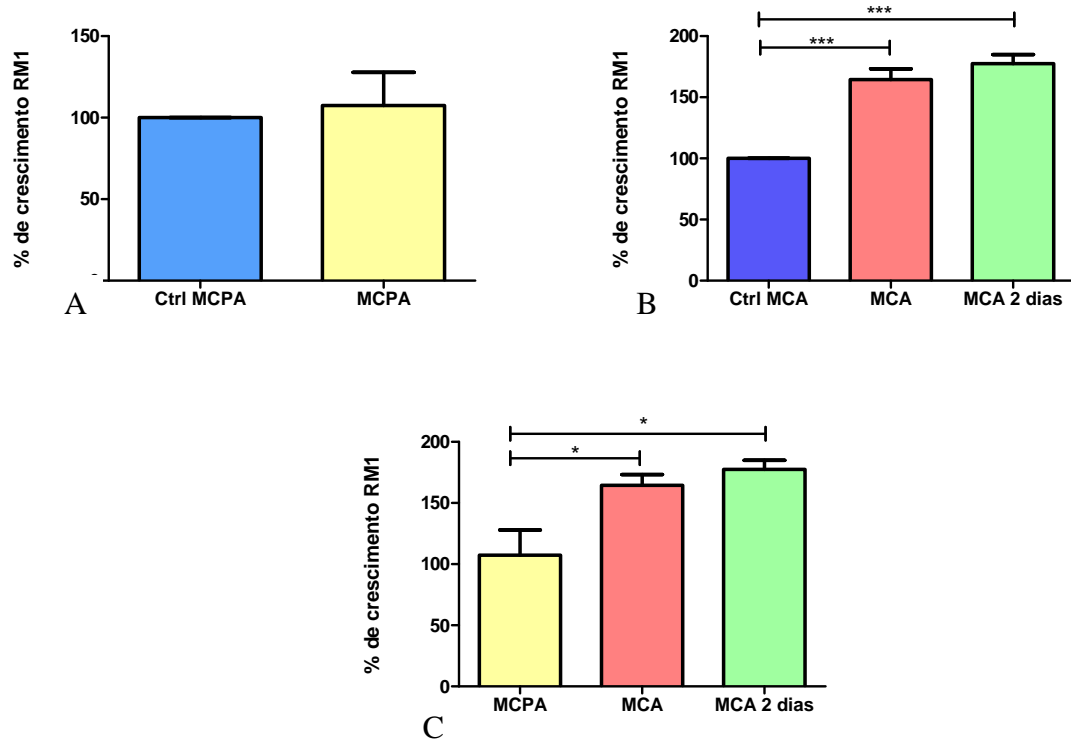
O crescimento celular das células RM1 na presença dos diferentes meios foi superior na presença do meio condicionado dos adipócitos de 24horas (Figura 14D) e do meio condicionado dos adipócitos 48horas (Figura 14E).



**Figura 14** – Ilustração do crescimento das células de carcinoma da próstata nas diferentes condições testadas. A- Ctrl MCPA; B- MCPA; C- Ctrl MCA; D- MCA; E- MCA dois dias (100x).

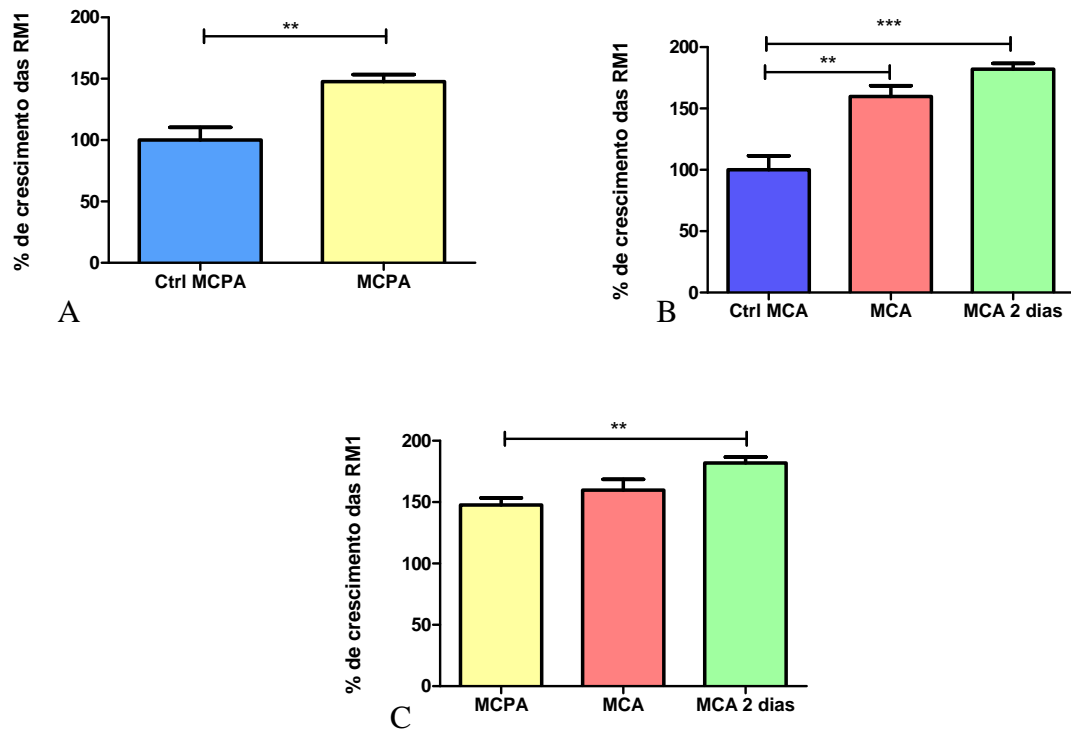
## **II. Avaliação da proliferação pela técnica de XTT**

Em relação à proliferação das células RM1 cultivadas com diferentes meios de cultura, quando avaliada pelo método indireto através da percentagem de redução do composto XTT, verificou-se que contrariamente aos resultados obtidos pelo método direto, o meio condicionado de adipócitos (MCA) de 24h e 48h (dois dias) apresentava diferenças significativas na proliferação das células RM1 em relação ao controlo ( $p < 0.001$ ), para as diferentes passagens utilizadas. Já o meio condicionado dos pré-adipócitos (MCPA) não apresentou diferenças significativas em relação ao seu controlo (Figura 15A e B). Quando comparado o efeito do meio condicionado dos pré-adipócitos com o meio condicionado dos adipócitos, também se observaram diferenças significativas ( $p < 0.05$ ) (Figura 14C).



**Figura 15-** Proliferação das células RM1 avaliado pelo método do XTT cultivadas com diferentes meios condicionados. A- Efeito do meio condicionado dos pré-adipócitos (MCPA) na proliferação celular. B- Efeito do meio condicionados dos adipócitos (MCA) de 24h e 48h no crescimento celular. C- Efeito do meio MCA (1 e 2 dias) em comparação com o meio MCPA (\*  $p < 0.05$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Quando analisadas as várias passagens individualmente, também se observaram diferenças significativas na proliferação celular entre MCA de 1 e dois dias com o seu controlo ( $p < 0.001$ ) (Figura 16B). Verificou-se também, uma diferença significativa entre o meio MCPA e o seu controlo ( $p < 0.01$ ), embora apenas nesta passagem (Figura 16A). Quando comparamos a proliferação com os diferentes meios verificaram-se diferenças significativas entre o meio MCA de dois dias e o meio MCPA ( $p < 0.01$ ), e entre o MCA de um dia e o MCPA não se observaram diferenças significativas apesar do meio MCA ter desencadeado maior proliferação (Figura 16C).

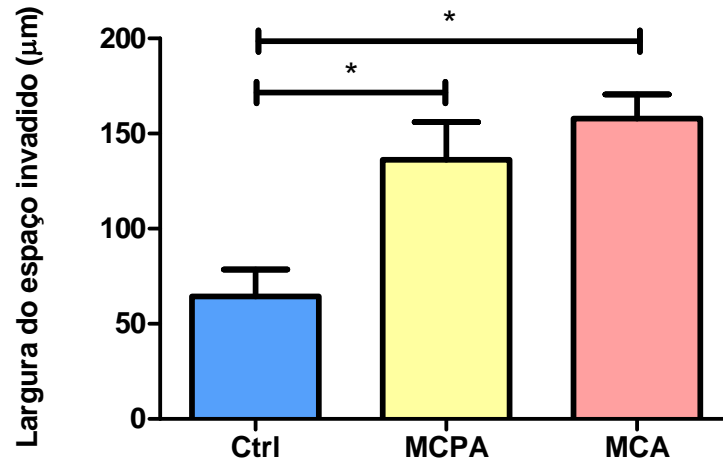


**Figura 16** - Proliferação das células RM1 da passagem 14 avaliado pelo método do XTT cultivadas com diferentes meios condicionados. A- Efeito do meio MCPA na proliferação celular. B- Efeito do meio MCA de 24h e 48h no crescimento celular. C- Efeito do meio MCA em comparação com o meio MCPA (\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

## 5. Migração das células RM1

A capacidade de migração das células foi avaliada pelo grau de preenchimento da área livre de células, onde foi realizada previamente a desagregação mecânica das mesmas. Pela análise do preenchimento do risco das imagens obtidas dos campos das placas de cultura de células RM1 observou-se diferenças significativas na migração das células cultivadas com meio MCA relativamente ao controlo ( $p < 0.05$ ), sendo que essas células apresentaram a região da desagregação mecânica quase totalmente re-preenchida, tendo uma maior área de preenchimento, após 24 horas, comparativamente com as células que foram cultivadas com meio normal (controlo) onde é possível identificar a região onde foi realizada a desagregação mecânica.

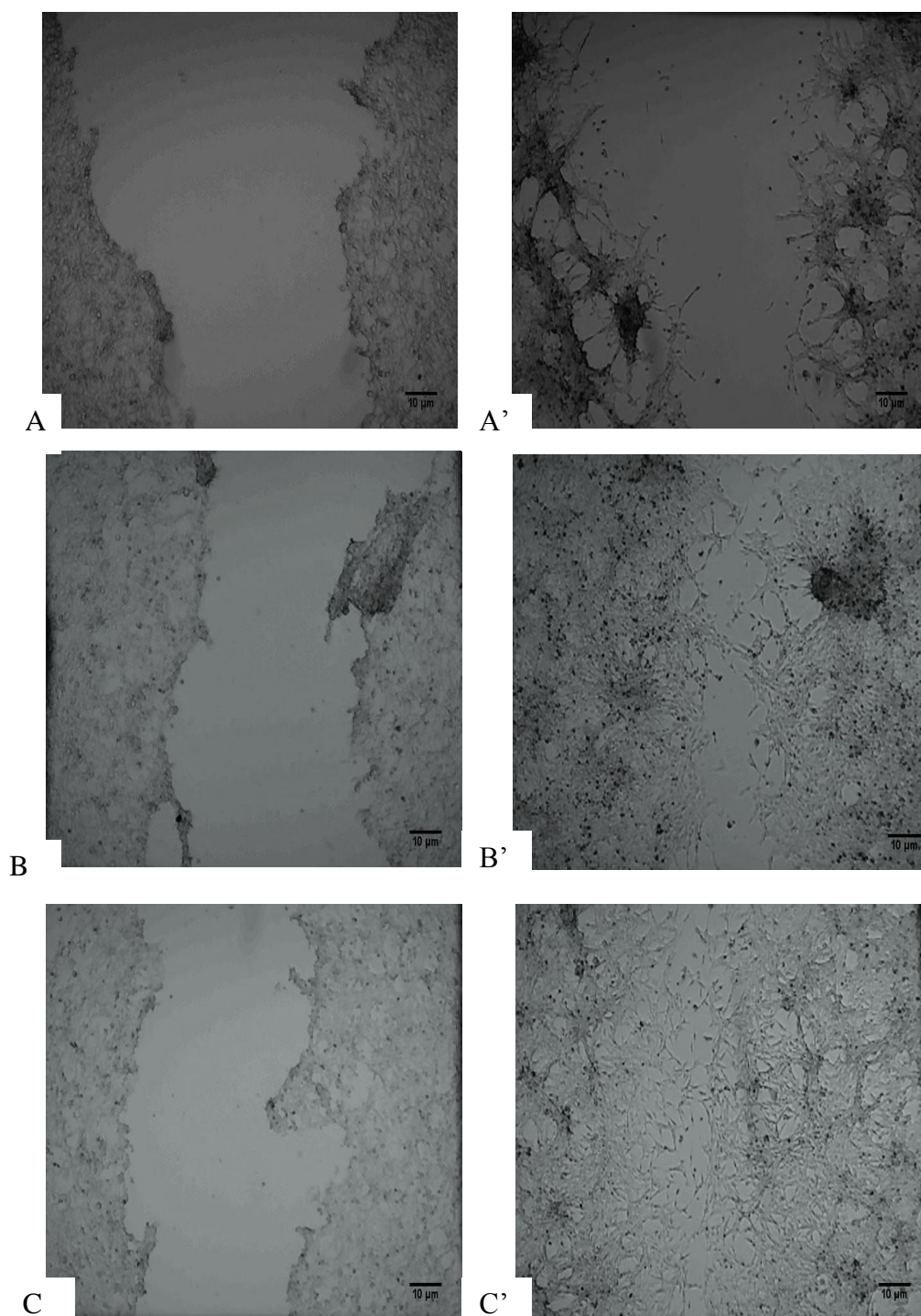
Em relação às células cultivadas com meio condicionado dos pré-adipócitos também se observou uma diferença significativa na área do espaço invadido das células cultivadas com este meio em relação ao controlo (Figura 17).



**Figura 17-** Área de preenchimento do traço pelas células RM1 das diferentes passagens estudadas, na presença de diferentes meios condicionados (\* $p < 0.05$ ).

Aliás, a figura 18 evidencia bem estas diferenças no preenchimento do traço, nas diferentes condições aferidas, demonstrando que no meio condicionado dos adipócitos a ocupação do espaço vazio é quase completa.





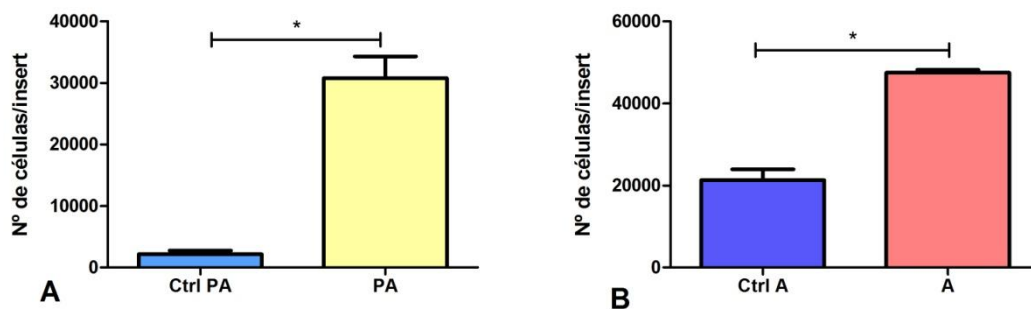
**Figura 18** – Imagens ilustrativas do risco e da percentagem de ocupação após 24h, nas diferentes condições testadas. A - Controlo; A' - Controlo 24h; B - MCPA 0h; B' – MCPA 24h; C- MCA 0h; C' - MCA 24h.

## 6. Avaliação da capacidade de invasão das células RM1

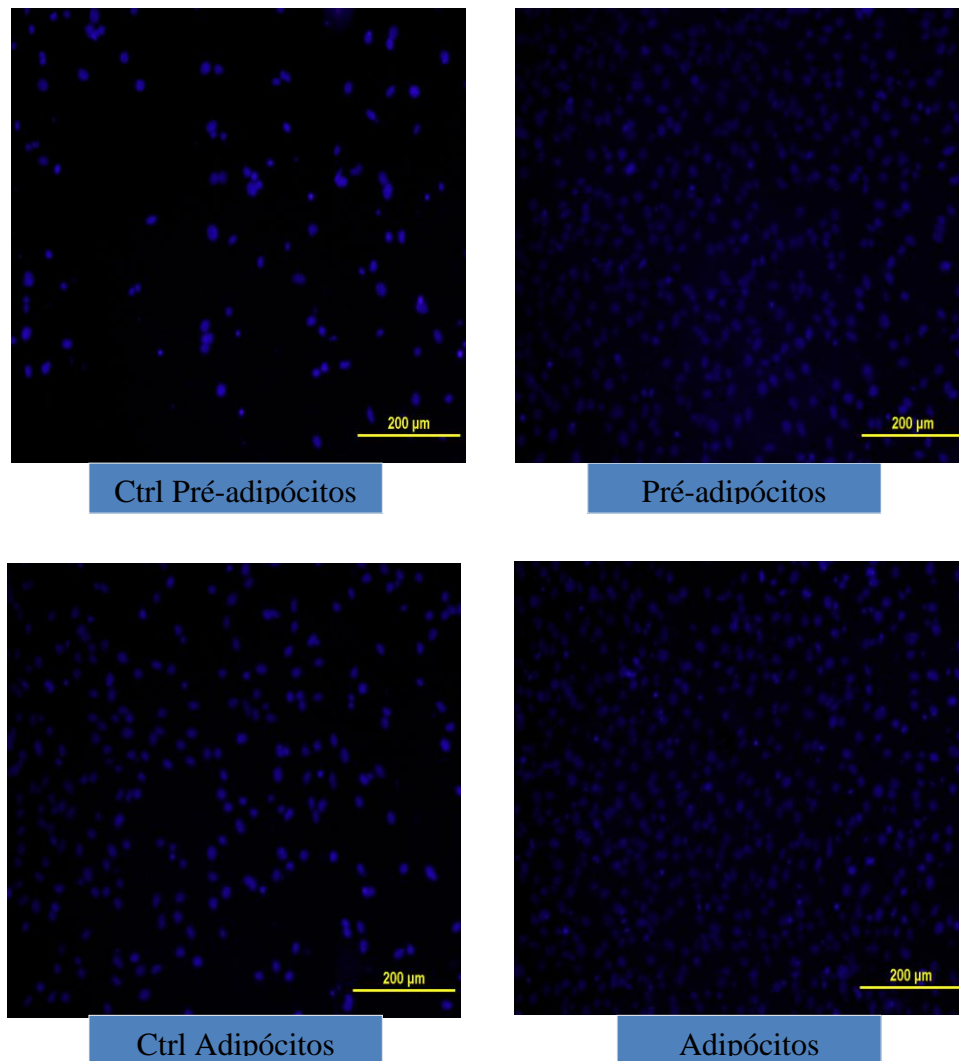
A capacidade de invasão das células RM1 na presença pré-adipócitos e adipócitos foi determinada pela quantidade de células que invadiu a membrana de matrigel tendo em conta a área do campo do microscópio e área total da membrana de matrigel.

Após análise e contagem das células que invadiram a membrana verificou-se uma diferença significativa no número de células que invadiram a membrana na presença de pré-adipócitos comparativamente com o controlo ( $p < 0.05$ ) (Figura 19A). Do mesmo modo, verificou-se um maior número de células que invadiram a membrana na presença de adipócitos comparativamente com o controlo ( $p < 0,05$ ) (Figura 19B). As mesmas diferenças podem ser observadas na figura 20, onde pode-se visualizar as células presentes na membrana de matrigel para as diferentes condições aferidas.

Verificou-se também que o número de células que invadiram a membrana foi mais elevado na presença de adipócitos comparativamente com os pré-adipócitos, contudo esta diferença não foi estatisticamente significativa



**Figura 19** – Número de células presentes na membrana de matrigel dos ensaios de invasão, nas diferentes condições aferidas. A- Células que invadiram a membrana cultivadas na presença de pré-adipócitos e o seu controlo. B- Células que invadiram a membrana, na presença de adipócitos e seu respectivo controlo (\*  $p < 0.05$ ).



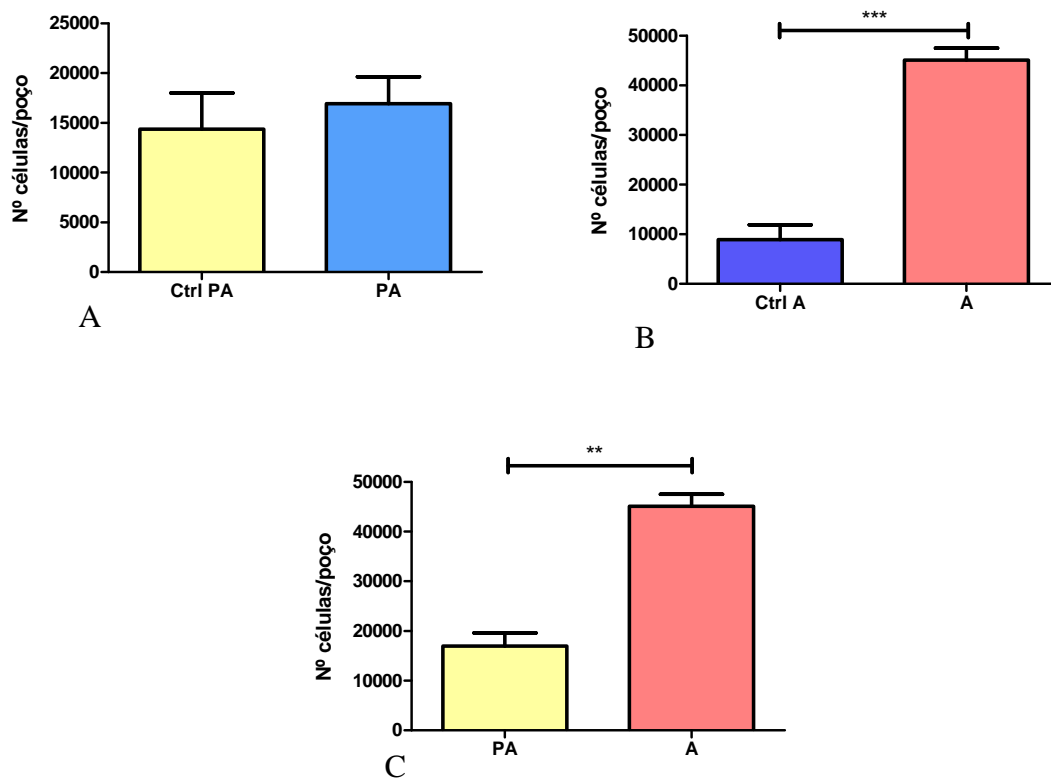
**Figura 20-** Invasão da membrana de matrigel pelas células RM1 nas diferentes condições.

## **7. Avaliação da proliferação das células RM1 em co-cultura com pré- e adipócitos**

Aquando da realização da co-cultura para avaliar o efeito direto dos adipócitos na proliferação das células RM1, verificou-se ser impossível avaliar a proliferação das células RM1, de modo direto de co-cultura, sem recurso a um sistema que separasse as células, uma vez que debaixo da monocamada de adipócitos existia uma monocamada de pré-adipócitos, com a mesma forma que as células tumorais, o que dificultava a sua distinção.

Então recorreu-se a um sistema de transwells próprio para co-cultura, com uma membrana porosa, para permitir o contacto das células, por mecanismos parácrinos para avaliar o referido efeito dos adipócitos nas células tumorais.

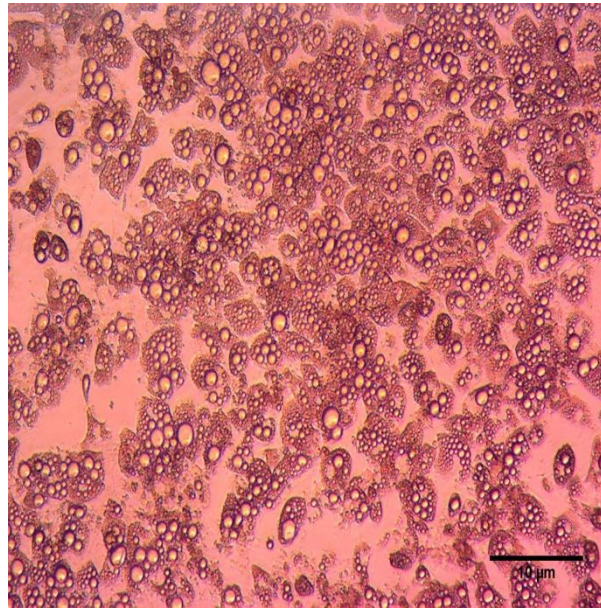
Pela análise dos resultados das co-culturas verificaram-se que os pré-adipócitos não alteram significativamente a proliferação celular das RM1 em relação ao seu controlo. No que diz respeito aos adipócitos verificou-se uma diferença significativa na proliferação das células na presença dos adipócitos relativamente ao seu controlo ( $p < 0.001$ ) (Figura 21 A, B). Quando comparamos o efeito destes dois tipos celulares provocam na proliferação verificou-se que os adipócitos conduzem a uma maior proliferação das células RM1 ( $p < 0.01$ ) (Figura 21C).



**Figura 21** – Proliferação celular das RM1 avaliada por citometria de fluxo. A- Proliferação celular das RM1 em co-cultura com pré-adipócitos comparativamente com o controlo. B- Proliferação das RM1 co-cultivadas com os adipócitos em relação ao seu controlo. C- Proliferação das células nas co-culturas com os dois tipos celulares (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ).

#### 8. Avaliação do efeito das células RM1 no fenótipo dos adipócitos em co-cultura

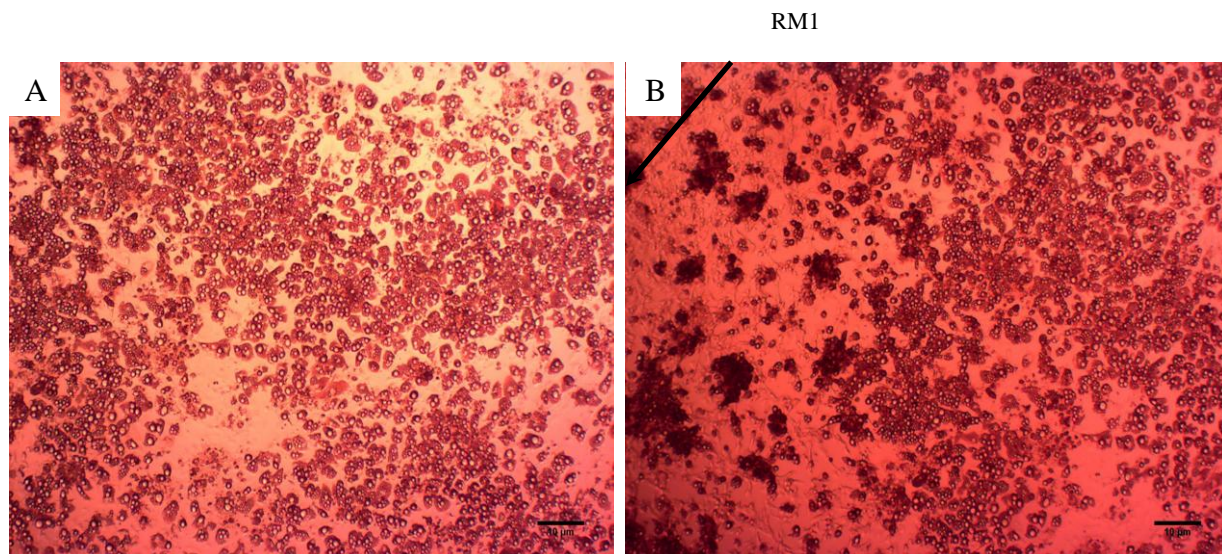
No processo de diferenciação, os adipócitos começam por apresentar numerosas gotículas lipídicas de pequenas dimensões, que com o amadurecimento do adipócito tendem a confluir e a formar uma grande e única gotícula lipídica, que ocupa a maior parte do citoplasma da célula (Figura 22).



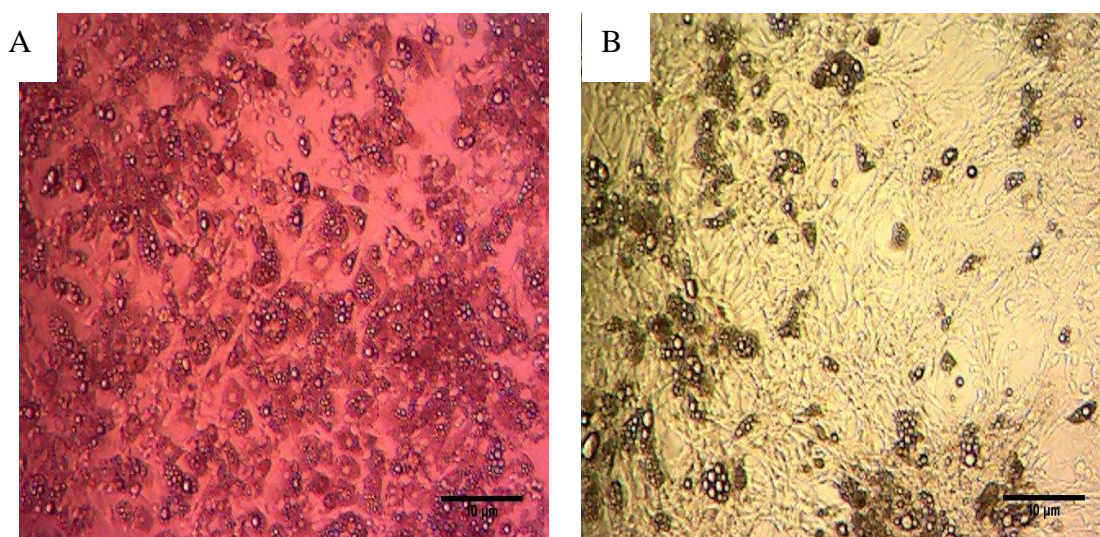
**Figura 22** – Células 3T3-L1 diferenciadas, evidenciando as gotículas lipídicas (200x).

Como já referindo anteriormente não foi possível avaliar o efeito dos pré-adipócitos e os adipócitos na proliferação das células, sem recurso a um sistema de transwells para realizar a co-cultura. Contudo, enquanto se otimizou as co-culturas sem este sistema verificou-se que os adipócitos na presença das referidas células tumorais modificavam o seu fenótipo, observando-se uma diminuição gradual ao longo do tempo dos adipócitos e sobretudo do conteúdo lipídico destes na região onde as células RM1 proliferavam (Figura 23 e 24), que inicialmente começavam por se aglomerar e posteriormente perdem a sua forma e as gotículas lipídicas que os constituem; no entanto, dado o crescimento acelerado das células RM1, não é possível verificar se esta alteração é devida a uma desdiferenciação dos adipócitos induzida pelas células RM1, ou a uma competição pelos nutrientes.





**Figura 23** – Efeito das células RM1 nos adipócitos. A- Adipócitos 3T3-L1 diferenciados, antes da co-cultura com RM1; B- Aspeto dos adipócitos após 24h em co-cultura (100x)



**Figura 24** – Efeito das RM1 nos adipócitos antes (A) e após 48 horas (B) em co-cultura (100x)

## **Capitulo IV: Discussão**

A possível associação entre a obesidade e o cancro tem suscitado alguma controvérsia, apesar de vários estudos epidemiológicos demonstrarem uma associação entre a obesidade e incidência e mortalidade por cancro. Porém, nem todos os tipos de cancro estão associados à obesidade, esta influência parece variável consoante a localização do tumor, sendo maior nos tumores que têm tecido adiposo na sua vizinhança (Nieman et al., 2013).

De acordo com alguns estudos, um dos mecanismos que parece estar subjacente ao risco de desenvolvimento tumoral associado à obesidade, parece ser o facto de esta situação patológica estar associada a um estado inflamatório crónico, com aumento da expressão de adipocinas pro-inflamatórias e de espécies reativas de oxigénio (ROS) que promovem progressão tumoral (Nieman et al., 2013).

Sabendo que o aumento da expressão de adipocinas pelo tecido adiposo observado na obesidade, é um dos principais mecanismos apontados como responsáveis pela progressão tumoral, invasão e metastização, estabeleceu-se como objetivo deste trabalho estudar a influência de mediadores produzidos pelos adipócitos na proliferação, invasão e migração de células de carcinoma da próstata androgénio independentes, recorrendo a meios condicionados de cultura de pré-adipócitos e adipócitos.

Foi utilizado como modelo de carcinoma da próstata a linha celular RM1 murina androgénio independente, de modo a minimizar a potencial interferência dos esteróides sexuais, uma vez que os adipócitos participam no metabolismo dos androgénios que constituem outro dos mecanismos que tem sido relatado como associado à progressão do cancro da próstata. A linha celular androgénio independente foi também escolhida, por ser o tipo de tumor da próstata no qual o possível efeito da obesidade é mais contraditório. Enquanto alguns autores defendem que o efeito das adipocinas na progressão tumoral é maior nas células androgénios independentes (Ribeiro et al., 2012b), outros afirmam que o efeito das adipocinas na progressão tumoral não é tão significativo nestes tumores prevalecendo outros mecanismos que promovem a proliferação celular, como o uso de vias alternativas para desencadear a proliferação (Nieman et al., 2013).

A primeira fase do estudo consistiu em determinar a concentração inicial de células RM1 a utilizar nos estudos subsequentes. Para isso, avaliou-se o crescimento ao longo do tempo de diferentes concentrações de células RM1, de modo a verificar qual teria um crescimento mais linear nas primeiras 36 horas após o início da cultura, correspondendo à



duração da maioria dos estudos subsequentes. Após análise das curvas de crescimento recorrendo a dois métodos distintos de avaliação da proliferação celular, um método direto de contagem do número de células em câmara de Neubauer e um método indireto onde se avalia a proliferação/ atividade metabólica através da percentagem de redução de um composto, o sal de tetrazólio (XTT), cuja relação entre a percentagem de redução do composto e a proliferação celular são lineares (Uzunoglu et al., 2010), foi escolhida a concentração inicial de  $4 \times 10^4$  células/mL para os estudos subsequentes em placas de 24 poços, e a concentração inicial de  $5 \times 10^4$  células/mL em placas de 96 poços por serem as que apresentavam um crescimento exponencial e ainda sem atingir a fase latente após 36 horas.

Em estudos prévios de caracterização das células RM1, foi demonstrado que estas células expressam o recetor da leptina e da insulina (Ribeiro et al., 2012a), tendo no presente trabalho sido avaliado o efeito de diferentes concentrações de insulina na sua proliferação, recorrendo aos mesmos dois métodos usados para determinar a curva de crescimento, embora recorrendo ao alamar blue como método indireto em vez do XTT. Ambos os reagentes têm princípios semelhantes, baseiam-se na redução metabólica de um composto para avaliar a proliferação celular, tendo uma relação linear entre a percentagem de redução do composto e a proliferação celular. A proliferação das células RM1 na presença das diferentes concentrações de insulina testadas, não apresentou diferenças significativas quando avaliada pelo método direto de câmara de Neubauer, apesar de se observar um ligeiro aumento na proliferação das células com a concentração de insulina mais elevada, contudo essa alteração não é significativa, tanto quando se analisou todas as passagens ou apenas uma delas. Foi realizada a análise em conjunto das passagens para averiguar se o que acontecia numa passagem se passava com todas as passagens, e por tanto ocorria em toda a população das células e não era característico de uma só passagem.

Quando se analisou os resultados do método indireto verificou-se que concentrações mais elevadas de insulina (1600nmol/L) desencadeavam maior proliferação das células RM1, tendo-se observado diferenças significativas da proliferação das células cultivadas com essa concentração de insulina em relação às concentrações mais baixas (0 e 200 nmol/L) quando se analisou todas as passagens em conjunto.

Um resultado semelhante observou-se quando analisamos uma só passagem, com as células em cultura com maiores concentrações de insulina a apresentarem um aumento significativo da proliferação em relação às concentrações mais baixas ( $p < 0.001$ ).

Embora não se tenha verificado efeito da insulina na proliferação das células no método direto, pelo método indireto verificou-se diferenças significativas, em todas as passagens o que nos leva a pensar que o método indireto será mais sensível que o método direto, e que a insulina terá efeito na proliferação das células RM1. Este resultado bem corroborar o que está descrito por alguns autores que demonstraram que a insulina interfere com a proliferação de células de carcinoma da próstata androgénio dependentes LNCaP, e androgénios independentes DU-145 e PC-3(Heidegger et al., 2012), apesar dos mesmos autores sugerirem que existem outros mecanismos que podem estar envolvidos neste processo, o que pode fazer com que o aumento da insulina, por si só, não seja suficiente para aumentar a proliferação das células de carcinoma da próstata, necessitando de outros fatores e/ou mecanismos associados, como por exemplo do IGF-1(Heidegger et al., 2012). O IGF-1 também parece ter um papel relevante no mecanismo de proliferação celular mediado pela insulina (Sayeed et al., 2013), uma vez que possui a capacidade de se ligar ao seu recetor (IGFR) mas também ao recetor da insulina (IR), tendo assim duas vias para promover a proliferação, podendo explicar este aumento da proliferação ((Philippou et al., 2013). O resultado obtido vai de encontro com o que alguns autores descreveram que o aumento da insulina após a terapêutica de inativação dos androgénios, pode ativar mecanismos subjacentes ao seu recetor que aumentam a sobrevivência das células de cancro da próstata e progressão para formas resistentes à castração (Gunter et al., 2012).

Os resultados obtidos contrariam um pouco os resultados obtidos previamente num estudo semelhante com as mesmas células RM1. Contudo, nesse mesmo estudo foram testadas concentrações de insulina mais baixas, o que poderá explicar a disparidade nos resultados (Ribeiro et al., 2012a), pois no presente estudo foram testadas concentrações de insulina mais elevadas, para simular as concentrações observadas na síndrome de resistência à insulina.

À semelhança do que foi feito com a insulina também se procedeu a análise do efeito da leptina (mais concretamente diferentes concentrações de leptina) na proliferação das células RM1. E a avaliação do efeito foi efetuado recorrendo somente ao método indireto, uma vez que o método direto apresenta sempre uma grande variedade nos resultados.

Pela análise dos resultados obtidos verificou-se que a leptina parece não interferir por si só na proliferação das células RM1, uma vez que não se verificou diferenças significativas na proliferação das células nas diferenças concentrações de leptina usadas,

tanto analisando uma passagem apenas ou o conjunto, embora na concentração mais elevada houvesse um ligeiro aumento da proliferação das células RM1.

Este resultado vem corroborar os resultados obtidos num estudo prévio com as mesmas células, onde não se verificaram diferenças significativas na proliferação das células, nas diferentes concentrações de leptina estudadas (Ribeiro et al., 2012a). Contudo, contraria o que a maioria dos autores defende, que a leptina tem efeitos na proliferação das células de carcinoma da próstata independentes dos androgénios (Hoda et al., 2012), estando mesmo associada a um maior risco de ter cancro da próstata mais agressivo, quando está em elevados níveis em circulação (Mistry et al., 2007).

No presente estudo foi ainda avaliado o efeito dos potenciais fatores produzidos pelos adipócitos na proliferação, migração e capacidade de invasão das células RM1.

O efeito na proliferação das células de carcinoma da próstata de diferentes meios de cultura condicionados foi avaliado após 24 horas em cultura com os respectivos meios, pelo método direto de contagem em camara de Neubauer e pelo método indireto do XTT, que avalia a proliferação celular pela percentagem de redução metabólica do sal de tetrazólio-XTT. O método do XTT foi utilizado como alternativa ao método de Alamar Blue após ter sido constatada a presença de interferência do meio condicionado com o mecanismo do método, impossibilitando a avaliação das diferenças na proliferação, uma vez que a percentagem de redução da resazurina era a mesma para diferentes concentrações de células.

Para efetuar este estudo foi necessário diferenciar os pré-adipócitos 3T3-L1 em adipócitos, recorrendo a adição de um cocktail hormonal ao meio de cultura com capacidade de atuar sobre dois fatores de transcrição, a Proteína Estimuladora de Ligação a CCAAT- a C/EBP  $\beta$  e  $\delta$ , que por sua vez vão estimular a expressão de dois reguladores da diferenciação dos adipócitos, o recetor gama ativado por proliferador de peroxisoma - PPAR- $\gamma$  e C/EBP- $\alpha$ , fatores de transcrição capazes de induzir a adipogénese e a expressão de muitos genes que determinam as características adipocíticas (Shao and Lazar, 1997, Zebisch et al., 2012, Green and Kehinde, 1975).

Pela análise dos resultados obtidos na contagem em câmara de Neubauer, verificou-se que o meio condicionado dos adipócitos parece influenciar a proliferação das células RM1, contudo não se observou diferenças significativas no efeito do meio condicionado dos adipócitos (MCA) de 24 e 48 horas comparativamente com o controlo, quando

analisando todas as passagens em conjunto, verificando-se apenas diferenças significativas na proliferação das células cultivadas com meio condicionado de adipócitos comparativamente com as células cultivadas com meio condicionado de pré-adipócitos. Analisando uma passagem individualmente verificou-se apenas diferenças significativas na proliferação entre as células cultivadas com meio condicionado de adipócitos e o controlo. Entre o meio condicionado dos adipócitos de 24 horas e 48 horas não se observaram diferenças significativas na proliferação das células RM1, mas comparando todos os meios condicionados verificou-se uma diferença significativa entre as células cultivadas com meio condicionado de adipócitos e o meio condicionado de pré-adipócitos. O meio condicionado dos pré-adipócitos não teve qualquer efeito na proliferação das células. Apesar de só se terem encontrado diferenças significativas numa das passagens, em todas as passagens o meio condicionado dos adipócitos conduziu a uma maior proliferação das células RM1 em comparação com o controlo, e o valor de p obtido foi muito próximo de 0.05, sugerindo que a dimensão da amostra possa ter sido insuficiente para demonstrar o efeito em todas as passagens estudadas.

Resultados semelhantes foram observados para o método indireto, onde foram observadas diferenças significativas na proliferação celular entre o meio condicionado de adipócitos de 24 e 48h comparativamente ao controlo e ao meio condicionado de pré-adipócitos, aquando da análise do efeito dos meios condicionados em todas as passagens em conjunto. Quando analisado o efeito na proliferação celular individualmente nas diferentes passagens, observou-se diferenças significativas entre o meio condicionado dos adipócitos de 24 e 48 horas com o controlo e com o meio condicionado dos pré-adipócitos. Com este método também se verificaram diferenças entre o meio condicionado dos pré-adipócitos e o seu controlo, obtendo-se uma diferença significativa no efeito destes numa das passagens estudadas. As diferenças nos resultados da avaliação da proliferação celular observadas entre os dois métodos podem advir do facto do método indireto ser mais sensível e menos susceptível a interferências do observador, do que o método da contagem direta, uma vez que na maioria das condições se observaram pequenos aglomerados de células, o que dificultou uma precisa contagem do número de células, podendo justificar as diferenças observadas entre os resultados. Estes resultados sugerem que, comparativamente com os pré-adipócitos, os adipócitos parecem segregar fatores que interferem com a proliferação das células de carcinoma da próstata, tal como já tinha sido sugerido em estudos anteriores efetuados noutras linhas celulares de carcinoma da próstata

(DU145, PC3, LNCaP) que demonstraram que o meio condicionado de adipócitos tem um efeito marcado na proliferação das células e que o meio condicionado dos pré-adipócitos apresenta um efeito mais moderado (Onuma et al., 2003). Além disso, vem corroborar o que já está descrito por outros autores, que defendem que a proliferação e a sobrevivência das células tumorais são influenciadas pelos adipócitos (Hefetz-Sela and Scherer, 2013, Kaneko et al., 2010)

A capacidade de migração das células RM1 foi avaliada através da área de preenchimento do local onde foi realizada a desagregação mecânica das células. Pela análise dos resultados verificou-se que as células cultivadas com meio condicionado dos adipócitos preencheram mais o espaço vazio do que as células cultivadas com meio de cultura normal (controlo) e as células cultivadas com meio condicionado dos pré-adipócitos, tendo mesmo se verificado diferenças significativas na área preenchida pelas células cultivadas com meio condicionado de adipócitos em comparação com o controlo. Verificou-se também que a área ocupada pelas células cultivadas com meio condicionado de pré-adipócitos foi significativamente maior comparativamente com o controlo. Estes resultados sugerem que os adipócitos, bem como os pré-adipócitos, sendo que estes últimos em menor quantidade, parecem produzir fatores com capacidade de estimular a motilidade/migração das células de carcinoma da próstata. Contudo, como hipótese alternativa, não se pode excluir que o preenchimento do espaço vazio possa ser devido ao aumento da proliferação que ocorre nas células cultivadas com meio condicionado, como também foi demonstrado e não só pelo aumento da capacidade de migração das células. Este resultado está de acordo com o observado em estudos de migração realizados com outras linhas celulares de carcinoma da próstata, onde verificou um aumento da migração das células cultivadas na presença de meio condicionado de adipócitos e de soros de ratinhos obesos (Ribeiro et al., 2012b, Price et al., 2012).

Relativamente a capacidade de invasão das células RM1 na presença de adipócitos e pré-adipócitos, avaliada pela contagem das células que invadiram a membrana de matrigel, demonstrou ser significativamente superior nas células que estavam na presença de adipócitos, tal como já tinha sugerido pelo resultado dos ensaios de migração celular, verificando-se um aumento significativo do número de células presentes na membrana de matrigel comparativamente com o controlo, o mesmo se verificou para as células que estavam na presença de pré-adipócitos em relação ao seu controlo. Deste modo, os adipócitos parecem influenciar a capacidade de invasão e migração das células tumorais,

androgénio independentes, podendo esse efeito ser mediado por fatores (adipocinas) segregados por estas células, mas não segregados ou segregados em menor quantidade pelos pré-adipócitos. Este efeito já tinha sido avaliado noutras linhas celulares de carcinoma da próstata, assim como noutros tipos de cancro, como o cancro da mama e ovário, tendo sido igualmente demonstrado um aumento da capacidade de invasão quando cultivadas com adipócitos ou seu respectivo meio condicionados (Ribeiro et al., 2012b, Dirat et al., 2011, Tan et al., 2011, Nieman et al., 2011). Neste ensaio, assim como nos ensaios de proliferação usaram-se diferentes controlos, para minimizar as interferências dos meios, uma vez que os meios condicionados têm diferentes meios base.

Em relação às co-culturas nos sistemas transwells verificou-se que tanto os pré-adipócitos com os adipócitos aumentam significativamente a proliferação das células RM1, mas comparando o efeito de dois tipos celulares na proliferação, verifica-se que esta foi significativamente maior nas células co-cultivadas com adipócitos. Estes resultados estão de acordo com o que já foi descrito por outros autores, que verificaram que os adipócitos em co-cultura com as células de cancro da próstata alteraram a sua proliferação (Tokuda et al., 2003). Este mesmo efeito dos adipócitos na proliferação das células tumorais também foi verificado em outros tipos de tumores, nomeadamente no cancro do colón e no da mama, onde verificaram que os adipócitos também aumentaram a proliferação celular (Amemori et al., 2007, Manabe et al., 2003)

Não foi possível realizar a co-cultura sem recurso a um sistema transwell, porque os adipócitos 3T3-L1 diferenciam-se a partir de pré-adipócitos, e estes permanecem na cultura após diferenciação dos adipócitos e são morfologicamente semelhantes às células de carcinoma da próstata, o que impossibilita a sua distinção para avaliação da proliferação das mesmas. Contudo, durante o processo de otimização das co-culturas foi observado que os adipócitos na presença das células RM1 alteravam a sua morfologia no sentido da diminuição do conteúdo lipídico, sugerindo a existência de mecanismos de desdiferenciação. Este resultado vem corroborar a teoria que as células tumorais interagem com o seu microambiente de forma a criar um ambiente favorável e estimular a sua progressão, tal como previamente havia sido demonstrado para o cancro da mama (Dirat et al., 2011, Tan et al., 2011, Hefetz-Sela and Scherer, 2013). Muitos autores defendem que o cancro interfere com o microambiente tumoral induzindo condições favoráveis à sua progressão, nomeadamente ao induzir uma série de mecanismos que levam à desdiferenciação dos adipócitos, alteração do perfil de produção de adipocinas e a perda do

conteúdo lipídico, utilizado como fonte de energia pelas células tumorais (Nieman et al., 2013).

Em resumo, os resultados apresentados nesta tese sobre o efeito dos pré-adipócitos e adipócitos e dos seus respetivos meios condicionados na proliferação, migração e invasão celular vêm contrariar a teoria que defende que o efeito da obesidade é menos relevante nas células de carcinoma da próstata androgénios independente, sugerindo que a obesidade e em particular o secretoma dos adipócitos, poderá ter um papel ativo na progressão deste tipo de cancro.

## **Capítulo V: Conclusão**



O presente estudo demonstrou que a insulina influencia a proliferação das células RM1 androgénio independentes, ao passo que a leptina não tem qualquer efeito sugerindo que devem existir outros mecanismos associados, que poderão ter um importante papel na progressão do tumor.

No entanto, os mediadores produzidos localmente pelos adipócitos, segregados para o meio, também demonstraram aumentar a capacidade de proliferação, invasão e metastização das células de carcinoma da próstata androgénio independentes. Por sua vez, as células de carcinoma da próstata também parecem promover alterações fenotípicas nos adipócitos, como a desdiferenciação e perda do conteúdo lipídico, evidenciando assim a possibilidade de interferirem com o microambiente tumoral de forma a promover a sua progressão.

Em suma, estes resultados reforçam a hipótese da obesidade estar relacionada com o risco de progressão e agressividade do cancro da próstata e que esse efeito possa ser desencadeado não só por mediadores sistémicos como a insulina, mas também por mediadores produzidos pelos adipócitos e pela interação despoletada pelas células tumorais no seu microambiente.

## **1. Prespectivas futuras**

De modo a complementar o presente estudo e melhor compreender o efeito da obesidade no cancro da próstata, nomeadamente quais os fatores segregados pelos adipócitos (adipocinas) que são responsáveis por desencadear o aumento da proliferação, invasão e migração, é nossa intenção efetuar a avaliação do perfil de adipocinas presentes nos meios condicionados e das co-culturas, de modo a determinar quais as adipocinas potencialmente responsáveis por estes mecanismos, assim como caracterizar os mecanismos moleculares subjacentes aos mesmos.

De modo a complementar o estudo do efeito dos adipócitos na proliferação verificado no presente estudo, deverá ser concluído o estudo da proliferação nas co-culturas.

Para confirmar que as células de carcinoma da próstata alteram o fenótipo dos adipócitos, deverá ser feita uma quantificação dos níveis de mRNA por RT-PCR dos marcadores adipocíticos como APN, resistina e de aP2, nos adipócitos que estiveram em co-cultura com as células tumorais.

Para avaliar se o efeito da obesidade nas células de carcinoma da próstata observado *in vitro*, também se reproduz *in vivo*, será avaliada a capacidade de proliferação e metastização das células androgénio independentes, por indução de um tumor em ratinhos e posterior avaliação da proliferação e metastização, após co-cultura com adipócitos e pré-adipócitos, assim como a avaliação do fenótipo dos adipócitos peritumorais.

## **Capitulo VI: Referências bibliográficas**

- AMEMORI, S., OOTANI, A., AOKI, S., FUJISE, T., SHIMODA, R., KAKIMOTO, T., SHIRAISHI, R., SAKATA, Y., TSUNADA, S., IWAKIRI, R. & FUJIMOTO, K. 2007. Adipocytes and preadipocytes promote the proliferation of colon cancer cells in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 292, G923-9.
- ANDERSON, D. R. Y. A. J. B. 2013. Screening for Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- ANKUR M. MANVAR, R. S. P., ERIC. M. WALLEN, AND MATTHEW E. NIELSEN 2013. Epidemiology of Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- ARCANGELI, S., PINZI, V. & ARCANGELI, G. 2012. Epidemiology of prostate cancer and treatment remarks. *World J Radiol*, 4, 241-6.
- ASMAR, R., BEEBE-DIMMER, J. L., KORGAVKAR, K., KEELE, G. R. & COONEY, K. A. 2013. Hypertension, obesity and prostate cancer biochemical recurrence after radical prostatectomy. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 16, 62-6.
- AZEVEDO, A., CUNHA, V., TEIXEIRA, A. L. & MEDEIROS, R. 2011. IL-6/IL-6R as a potential key signaling pathway in prostate cancer development. *World J Clin Oncol*, 2, 384-96.
- BALEY, P. A., YOSHIDA, K., QIAN, W., SEHGAL, I. & THOMPSON, T. C. 1995. Progression to androgen insensitivity in a novel in vitro mouse model for prostate cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 52, 403-13.
- BASSETT, J. K., SEVERI, G., BAGLIETTO, L., MACINNIS, R. J., HOANG, H. N., HOPPER, J. L., ENGLISH, D. R. & GILES, G. G. 2012. Weight change and prostate cancer incidence and mortality. *Int J Cancer*, 131, 1711-9.
- BRAUN, D. P., GUPTA, D. & STAREN, E. D. 2012. Predicting survival in prostate cancer: the role of quality of life assessment. *Support Care Cancer*, 20, 1267-74.
- BRAWLEY, O. W. 2012. Prostate cancer epidemiology in the United States. *World J Urol*, 30, 195-200.
- BRAY, F., LORTET-TIEULENT, J., FERLAY, J., FORMAN, D. & AUVINEN, A. 2010. Prostate cancer incidence and mortality trends in 37 European countries: an overview. *Eur J Cancer*, 46, 3040-52.
- CAO, Y. & MA, J. 2011. Body mass index, prostate cancer-specific mortality, and biochemical recurrence: a systematic review and meta-analysis. *Cancer Prev Res (Phila)*, 4, 486-501.
- CASEY K. NG, E. C. K., AND HOSSEIN JADVAR 2013. Molecular Imaging in Diagnostics. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- CHEUNG, W. W. & MAO, P. 2012. Recent advances in obesity: genetics and beyond. *ISRN Endocrinol*, 2012, 536905.
- CORN, P. G. 2012. The tumor microenvironment in prostate cancer: elucidating molecular pathways for therapy development. *Cancer Manag Res*, 4, 183-93.
- CRAWFORD, E. D. 2009. Understanding the epidemiology, natural history, and key pathways involved in prostate cancer. *Urology*, 73, S4-10.
- DAGVADORJ, A., COLLINS, S., JOMAIN, J. B., ABDULGHANI, J., KARRAS, J., ZELLWEGER, T., LI, H., NURMI, M., ALANEN, K., MIRTITI, T., VISAKORPI, T., BUBENDORF, L., GOFFIN, V. & NEVALAINEN, M. T. 2007. Autocrine prolactin promotes prostate cancer cell growth via Janus kinase-2-signal transducer and activator of transcription-5a/b signaling pathway. *Endocrinology*, 148, 3089-101.
- DIRAT, B., BOCHET, L., DABEK, M., DAVIAUD, D., DAUVILLIER, S., MAJED, B., WANG, Y. Y., MEULLE, A., SALLES, B., LE GONIDEC, S., GARRIDO, I., ESCOURROU, G., VALET, P. & MULLER, C. 2011. Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res*, 71, 2455-65.
- DISCACCIATI, A., ORSINI, N. & WOLK, A. 2012. Body mass index and incidence of localized and advanced prostate cancer--a dose-response meta-analysis of prospective studies. *Ann Oncol*, 23, 1665-71.
- DONOHUE, C. L., DOYLE, S. L. & REYNOLDS, J. V. 2011. Visceral adiposity, insulin resistance and cancer risk. *Diabetol Metab Syndr*, 3, 12.
- ECCLES, S. A., BOX, C. & COURT, W. 2005. Cell migration/invasion assays and their application in cancer drug discovery. *Biotechnol Annu Rev*, 11, 391-421.
- FERLAY, J., SHIN, H. R., BRAY, F., FORMAN, D., MATHERS, C. & PARKIN, D. M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, 2893-917.
- FOROUDI, K.-H. T. A. F. 2013. Management of Bone Metastases. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- FORTE, V., PANDEY, A., ABDELMESSIH, R., FORTE, G., WHALEY-CONNELL, A., SOWERS, J. R. & MCFARLANE, S. I. 2012. Obesity, Diabetes, the Cardiorenal Syndrome, and Risk for Cancer. *Cardiorenal Med*, 2, 143-162.

- FOWKE, J. H., MOTLEY, S. S., CONCEPCION, R. S., PENSON, D. F. & BAROCAS, D. A. 2012. Obesity, body composition, and prostate cancer. *BMC Cancer*, 12, 23.
- FRANCOIS LAMOUREUX, A. Z., AND MARTIN E. GLEAVE 2013. Molecular Mechanisms of Castrate Resistant Prostate Cancer *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- GALIC, S., OAKHILL, J. S. & STEINBERG, G. R. 2010. Adipose tissue as an endocrine organ. *Mol Cell Endocrinol*, 316, 129-39.
- GERRITSEN, W. R. & SHARMA, P. 2012. Current and emerging treatment options for castration-resistant prostate cancer: a focus on immunotherapy. *J Clin Immunol*, 32, 25-35.
- GREEN, H. & KEHINDE, O. 1975. An established preadipose cell line and its differentiation in culture II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell*, 5, 19-27.
- GREEN, H. & MEUTH, M. 1974. An established pre-adipose cell line and its differentiation in culture. *Cell*, 3, 127-33.
- GUNTER, J. H., LUBIK, A. A., MCKENZIE, I., POLLAK, M. & NELSON, C. C. 2012. The Interactions between Insulin and Androgens in Progression to Castrate-Resistant Prostate Cancer. *Advances in Urology*, 2012, 11.
- HAMID, J. A. S. A. R. A. H. 2013. Next Generation Screening Tests. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- HAMMARSTEN, P. 2008. *Androgen Controlled Regulatory Systems in Prostate Cancer: Potential New Therapeutic Targets and Prognostic Markers*, Umeå University.
- HEFETZ-SELA, S. & SCHERER, P. E. 2013. Adipocytes: impact on tumor growth and potential sites for therapeutic intervention. *Pharmacol Ther*, 138, 197-210.
- HEGARTY, P. K. H. A. N. J. 2013. Natural History of Prostate Cancer. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- HEIDEGGER, I., OFER, P., DOPPLER, W., ROTTER, V., KLOCKER, H. & MASSONER, P. 2012. Diverse functions of IGF/insulin signaling in malignant and noncancerous prostate cells: proliferation in cancer cells and differentiation in noncancerous cells. *Endocrinology*, 153, 4633-43.
- HENDERSON, A. 2013. Disease Risk Stratification. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- HIDEAKI MIYAKE, A. T., AND MASATO FUJISAWA 2013. Biomarkers of Potential Therapeutic Value. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- HODA, M. R., THEIL, G., MOHAMMED, N., FISCHER, K. & FORNARA, P. 2012. The adipocyte-derived hormone leptin has proliferative actions on androgen-resistant prostate cancer cells linking obesity to advanced stages of prostate cancer. *J Oncol*, 2012, 280386.
- HSING, A. W. & CHOKKALINGAM, A. P. 2006. Prostate cancer epidemiology. *Front Biosci*, 11, 1388-413.
- IBRAHIM, T., FLAMINI, E., MERCATALI, L., SACANNA, E., SERRA, P. & AMADORI, D. 2010. Pathogenesis of osteoblastic bone metastases from prostate cancer. *Cancer*, 116, 1406-18.
- JEMAL, A., BRAY, F., CENTER, M. M., FERLAY, J., WARD, E. & FORMAN, D. 2011. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 61, 69-90.
- JENSTER, D. D. A. G. 2013. Tumor Markers. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- JIN, J. K., DAYYANI, F. & GALLICK, G. E. 2011. Steps in prostate cancer progression that lead to bone metastasis. *Int J Cancer*, 128, 2545-61.
- JOHANSSON, J. E., ANDREN, O., ANDERSSON, S. O., DICKMAN, P. W., HOLMBERG, L., MAGNUSON, A. & ADAMI, H. O. 2004. Natural history of early, localized prostate cancer. *JAMA*, 291, 2713-9.
- JR, J. A. S. 2013. Radical Treatment for Localized Disease: An Overview of Options and Strategies for Decision Making. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- KAIDAR-PERSON, O., BAR-SELA, G. & PERSON, B. 2011. The two major epidemics of the twenty-first century: obesity and cancer. *Obes Surg*, 21, 1792-7.
- KANASAKI, K. & KOYA, D. 2011. Biology of obesity: lessons from animal models of obesity. *J Biomed Biotechnol*, 2011, 197636.
- KANEKO, A., SATOH, Y., TOKUDA, Y., FUJIYAMA, C., UDO, K. & UOZUMI, J. 2010. Effects of adipocytes on the proliferation and differentiation of prostate cancer cells in a 3-D culture model. *Int J Urol*, 17, 369-76.
- KATZ, P. J. C. A. A. E. 2013a. Diet and Prostate Cancer: A Holistic Approach to Management. *In: TEWARI, A. (ed.) Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.

- KATZ, P. J. C. A. A. E. 2013b. Diet and Prostate Cancer: A Holistic Approach to Management . In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- KOOCHKPOUR, S. 2011. Genetic and epigenetic changes in human prostate cancer. *Iran Red Crescent Med J*, 13, 80-98.
- KUMAR, V. 2013. Other Pharmaceutical Agents in the Chemoprevention of Prostate Cancer . In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- KWON, E. M., SALINAS, C. A., KOLB, S., FU, R., FENG, Z., STANFORD, J. L. & OSTRANDER, E. A. 2011. Genetic polymorphisms in inflammation pathway genes and prostate cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 20, 923-33.
- LEIBOWITZ-AMIT, R. & JOSHUA, A. M. 2012. Targeting the androgen receptor in the management of castration-resistant prostate cancer: rationale, progress, and future directions. *Curr Oncol*, 19, S22-31.
- LEITZMANN, M. F. & ROHRMANN, S. 2012. Risk factors for the onset of prostatic cancer: age, location, and behavioral correlates. *Clin Epidemiol*, 4, 1-11.
- LEZE, E., ALVES-PEREIRA, J. L., COLLI, S., CAVALCANTE, F. S., JOSE SAMPAIO, F. & DA FONTE RAMOS, C. 2012. Leptin regulates proliferation and apoptosis in human prostate. *ScientificWorldJournal*, 2012, 842301.
- LI, H., STAMPFER, M. J., MUCCI, L., RIFAI, N., QIU, W., KURTH, T. & MA, J. 2010. A 25-year prospective study of plasma adiponectin and leptin concentrations and prostate cancer risk and survival. *Clin Chem*, 56, 34-43.
- LORIOT, Y., MASSARD, C. & FIZAZI, K. 2012. Recent developments in treatments targeting castration-resistant prostate cancer bone metastases. *Ann Oncol*, 23, 1085-94.
- MANABE, Y., TODA, S., MIYAZAKI, K. & SUGIHARA, H. 2003. Mature adipocytes, but not preadipocytes, promote the growth of breast carcinoma cells in collagen gel matrix culture through cancer-stromal cell interactions. *J Pathol*, 201, 221-8.
- MILLER, G. J. & TORKKO, K. C. 2001. Natural history of prostate cancer--epidemiologic considerations. *Epidemiol Rev*, 23, 14-8.
- MISTRY, T., DIGBY, J. E., DESAI, K. M. & RANDEVA, H. S. 2007. Obesity and prostate cancer: a role for adipokines. *Eur Urol*, 52, 46-53.
- NEAL, G. L. S. A. D. E. 2013. Molecular Biology and Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- NELSON, B. M. A. P. S. 2013. Androgen and Androgen Receptor-Directed Therapy as Initial Treatment for Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- NIEMAN, K. M., KENNY, H. A., PENICKA, C. V., LADANYI, A., BUELL-GUTBROD, R., ZILLHARDT, M. R., ROMERO, I. L., CAREY, M. S., MILLS, G. B., HOTAMISLIGIL, G. S., YAMADA, S. D., PETER, M. E., GWIN, K. & LENGUEL, E. 2011. Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nat Med*, 17, 1498-503.
- NIEMAN, K. M., ROMERO, I. L., VAN HOUTEN, B. & LENGUEL, E. 2013. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim Biophys Acta*.
- NTAIS, C., POLYCARPOU, A. & TSATSOULIS, A. 2003. Molecular epidemiology of prostate cancer: androgens and polymorphisms in androgen-related genes. *Eur J Endocrinol*, 149, 469-77.
- ONUMA, M., BUB, J. D., RUMMEL, T. L. & IWAMOTO, Y. 2003. Prostate Cancer Cell-Adipocyte Interaction: LEPTIN MEDIATES ANDROGEN-INDEPENDENT PROSTATE CANCER CELL PROLIFERATION THROUGH c-Jun NH2-TERMINAL KINASE. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 42660-42667.
- ORTEGA, M. T., XIE, L., MORA, S. & CHAPES, S. K. 2011. Evaluation of macrophage plasticity in brown and white adipose tissue. *Cell Immunol*, 271, 124-33.
- PARK, J., EUHUS, D. M. & SCHERER, P. E. 2011. Paracrine and endocrine effects of adipose tissue on cancer development and progression. *Endocr Rev*, 32, 550-70.
- PARRAY, A., SIDDIQUE, H. R., NANDA, S., KONETY, B. R. & SALEEM, M. 2012. Castration-resistant prostate cancer: potential targets and therapies. *Biologics*, 6, 267-76.
- PAZ-FILHO, G., LIM, E. L., WONG, M. L. & LICINIO, J. 2011. Associations between adipokines and obesity-related cancer. *Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 1634-50.
- PETRICON, S. S. K. A. E. 2013. The Proteomic Approach to Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- PHILIPPOU, A., ARMAKOLAS, A. & KOUTSILIERIS, M. 2013. Evidence for the Possible Biological Significance of the igf-1 Gene Alternative Splicing in Prostate Cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 4, 31.

- POP, P. D. O. P.-. 2013. *Os números do cancro da próstata em Portugal* [Online]. Available: <http://www.pop.eu.com/portal/publico-geral/tipos-de-cancro/cancro-da-prostata.html#numeros>.
- PRICE, R. S., CAVAZOS, D. A., DE ANGEL, R. E., HURSTING, S. D. & DEGRAFFENRIED, L. A. 2012. Obesity-related systemic factors promote an invasive phenotype in prostate cancer cells. *Prostate Cancer Prostatic Dis*, 15, 135-43.
- PRIETO-HONTORIA, P. L., PEREZ-MATUTE, P., FERNANDEZ-GALILEA, M., BUSTOS, M., MARTINEZ, J. A. & MORENO-ALIAGA, M. J. 2011. Role of obesity-associated dysfunctional adipose tissue in cancer: a molecular nutrition approach. *Biochim Biophys Acta*, 1807, 664-78.
- RAJESH NAIR, J. W., SUKANYA GHOSH, AND ALASTAIR HENDERSON 2013. Early-Detection and Patient Risk Stratification in Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- RANASINGHE, W. K., XIAO, L., KOVAC, S., CHANG, M., MICHIELS, C., BOLTON, D., SHULKES, A., BALDWIN, G. S. & PATEL, O. 2013. The role of hypoxia-inducible factor 1alpha in determining the properties of castrate-resistant prostate cancers. *PLoS One*, 8, e54251.
- RIBEIRO, A. M., ANDRADE, S., PINHO, F., MONTEIRO, J. D., COSTA, M., LOPES, C., AGUAS, A. P. & MONTEIRO, M. P. 2010. Prostate cancer cell proliferation and angiogenesis in different obese mice models. *Int J Exp Pathol*, 91, 374-86.
- RIBEIRO, A. M., PEREIRA, S., ANDRADE, S., COSTA, M., LOPES, C., AGUAS, A. P. & MONTEIRO, M. P. 2012a. Insulin prevents leptin inhibition of RM1 prostate cancer cell growth. *Pathol Oncol Res*, 18, 499-507.
- RIBEIRO, R., MONTEIRO, C., CUNHA, V., OLIVEIRA, M. J., FREITAS, M., FRAGA, A., PRINCIPE, P., LOBATO, C., LOBO, F., MORAIS, A., SILVA, V., SANCHES-MAGALHAES, J., OLIVEIRA, J., PINA, F., MOTA-PINTO, A., LOPES, C. & MEDEIROS, R. 2012b. Human periprostatic adipose tissue promotes prostate cancer aggressiveness in vitro. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 32.
- RIBEIRO, R. J., MONTEIRO, C. P., CUNHA, V. F., AZEVEDO, A. S., OLIVEIRA, M. J., MONTEIRO, R., FRAGA, A. M., PRINCIPE, P., LOBATO, C., LOBO, F., MORAIS, A., SILVA, V., SANCHES-MAGALHAES, J., OLIVEIRA, J., GUIMARAES, J. T., LOPES, C. M. & MEDEIROS, R. M. 2012c. Tumor cell-educated periprostatic adipose tissue acquires an aggressive cancer-promoting secretory profile. *Cell Physiol Biochem*, 29, 233-40.
- ROBINSON, M. S. A. B. D. 2013. The Pathology of Prostatic Carcinoma. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- ROJAS, A., LIU, G., COLEMAN, I., NELSON, P. S., ZHANG, M., DASH, R., FISHER, P. B., PLYMATE, S. R. & WU, J. D. 2011. IL-6 promotes prostate tumorigenesis and progression through autocrine cross-activation of IGF-IR. *Oncogene*, 30, 2345-55.
- ROTTENBERG, B. J. C. A. G. 2013. The Staging of Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- SAAD, J.-B. L. A. F. 2013. Bone Health: Prevention of Skeletal-Related Events and Palliative Care. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- SACCA, P. A., CREYDT, V. P., CHOI, H., MAZZA, O. N., FLETCHER, S. J., VALLONE, V. B., SCORTICATI, C., CHASSEING, N. A. & CALVO, J. C. 2012. Human periprostatic adipose tissue: its influence on prostate cancer cells. *Cell Physiol Biochem*, 30, 113-22.
- SARDANA, G. & DIAMANDIS, E. P. 2012. Biomarkers for the diagnosis of new and recurrent prostate cancer. *Biomark Med*, 6, 587-96.
- SAYEED, A., FEDELE, C., TREROTOLA, M., GANGULY, K. K. & LANGUINO, L. R. 2013. IGF-IR Promotes Prostate Cancer Growth by Stabilizing alpha5beta1 Integrin Protein Levels. *PLoS One*, 8, e76513.
- SHAO, D. & LAZAR, M. A. 1997. Peroxisome Proliferator Activated Receptor  $\gamma$ , CCAAT/ Enhancer-binding Protein  $\alpha$ , and Cell Cycle Status Regulate the Commitment to Adipocyte Differentiation. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 21473-21478.
- SINGH, R. P. & AGARWAL, R. 2006. Mechanisms of action of novel agents for prostate cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer*, 13, 751-78.
- SLUKA, P. & DAVIS, I. D. 2013. Cell mates: paracrine and stromal targets for prostate cancer therapy. *Nat Rev Urol*, 10, 441-51.
- SONYA VASTO, E. I., VITALE MICELI, AND GIUSEPPE CARRUBA 2013. Inflammation and Cancer of the Prostate. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- SUN, K., KUSMINSKI, C. M. & SCHERER, P. E. 2011. Adipose tissue remodeling and obesity. *J Clin Invest*, 121, 2094-101.

- TAN, J., BUACHE, E., CHENARD, M. P., DALI-YOUCHEF, N. & RIO, M. C. 2011. Adipocyte is a non-trivial, dynamic partner of breast cancer cells. *Int J Dev Biol*, 55, 851-9.
- TILG, H. & MOSCHEN, A. R. 2006. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*, 6, 772-83.
- TINDALL, K. D. A. D. J. 2013. Endocrine Mechanisms, Androgen Receptor and Carcinogenesis, and Hormone Escape. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- TODARO, G. J. & GREEN, H. 1963. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. *J Cell Biol*, 17, 299-313.
- TOKUDA, Y., SATOH, Y., FUJIYAMA, C., TODA, S., SUGIHARA, H. & MASAKI, Z. 2003. Prostate cancer cell growth is modulated by adipocyte-cancer cell interaction. *BJU Int*, 91, 716-20.
- UZUNOGLU, S., KARACA, B., ATMACA, H., KISIM, A., SEZGIN, C., KARABULUT, B. & USLU, R. 2010. Comparison of XTT and Alamar blue assays in the assessment of the viability of various human cancer cell lines by AT-101 (–/– gossypol). *Toxicology Mechanisms and Methods*, 20, 482-486.
- VALÉRIE FONTEYNE, P. O., NICOLAAS LUMEN, GEERT M. VILLEIRS, AND GERT O. DE MEERLEER 2013. Management of High-Risk/Locally Advanced Disease. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- VAN KRUIJSDIJK, R. C., VAN DER WALL, E. & VISSEREN, F. L. 2009. Obesity and cancer: the role of dysfunctional adipose tissue. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 18, 2569-78.
- VERMA, M., PATEL, P. & VERMA, M. 2011. Biomarkers in Prostate Cancer Epidemiology. *Cancers*, 3, 3773-3798.
- WILLIAM G. NELSON, M. C. H., ANGELO M. DE MARZO, AND SRINIVASAN YEGNASUBRAMANIAN 2013. Epigenetic Changes in Prostate Cancer. In: TEWARI, A. (ed.) *Prostate Cancer: A Comprehensive Perspective*. Springer London, Limited.
- XIANG, Y. Z., XIONG, H., CUI, Z. L., JIANG, S. B., XIA, Q. H., ZHAO, Y., LI, G. B. & JIN, X. B. 2013. The association between metabolic syndrome and the risk of prostate cancer, high-grade prostate cancer, advanced prostate cancer, prostate cancer-specific mortality and biochemical recurrence. *J Exp Clin Cancer Res*, 32, 9.
- ZEBISCH, K., VOIGT, V., WABITSCH, M. & BRANDSCH, M. 2012. Protocol for effective differentiation of 3T3-L1 cells to adipocytes. *Anal Biochem*, 425, 88-90.



